

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
DENISE LABERGE

MICROTEST DE PHYTOTOXICITÉ
À BASE DE MEMBRANES PHOTOSYNTHÉTIQUES IMMOBILISÉES

AVRIL 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

AVANT-PROPOS

Ce travail de recherche est présenté sous la forme de deux articles scientifiques. La présentation de l'article du Chapitre 2 respecte les recommandations aux auteurs du journal *Environmental toxicology and chemistry*. Quant à l'article du Chapitre 3, sa présentation est conforme aux recommandations aux auteurs du journal *Enzyme and microbial technology*.

Les deux articles ayant été rédigés en anglais, des résumés substantiels en français apparaissent aux annexes A et B respectivement.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur, le Dr Robert Carpentier, pour la confiance et le soutien qu'il m'a témoignés. Je lui suis reconnaissante pour toute la latitude dont j'ai bénéficié, ce projet de recherche ayant contribué à rafraîchir mes connaissances scientifiques tout en me permettant de développer autonomie et créativité.

Mes remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe du laboratoire, car je suis persuadée que la réussite d'un tel projet s'appuie sur le support et l'entraide des personnes qui nous entourent. Un merci particulier à Nathalie pour ses conseils fort appréciés.

Je remercie le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada pour m'avoir accordé une bourse de deuxième cycle. Une aide financière reçue du Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (gouvernement du Québec) a permis l'expérience très enrichissante d'un stage de recherche dans un laboratoire français. Je suis reconnaissante au Dr Régis Rouillon pour l'accueil des plus chaleureux au Centre de Phytopharmacie de l'Université de Perpignan.

Enfin, mon conjoint et mes enfants ont été présents tout au long de ce travail par leur compréhension et leurs encouragements continuels. À vous quatre, un merci bien spécial.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
AVANT-PROPOS	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES	viii
CHAPITRES	
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Notions de photosynthèse	3
1.3 Principe du microtest de phytotoxicité.....	6
1.4 Objectifs de la recherche	7
2. IN VITRO PHYTOTOXICITY SCREENING TEST USING IMMOBILIZED SPINACH THYLAKOIDS	12
Abstract.....	13
Introduction	14
Materials and methods.....	15
Toxic products	15

Preparation of thylakoid membranes	16
Immobilization of thylakoid membranes	16
Experimental set-up.	17
Experimentation and data treatment.	18
Results.	19
Establishing the optimal conditions.	19
Reproducibility of the thylakoids phytotoxicity test.	22
Responses to different classes of herbicides.	23
Discussion.	25
Acknowledgement.	29
References.	30
3. COMPARATIVE STUDY OF THYLAKOID MEMBRANES SENSITIVITY FOR HERBICIDE DETECTION AFTER PHYSICAL OR CHEMICAL IMMOBILIZATION.	49
Abstract.	50
Introduction.	51
Materials and methods.	52
Preparation of thylakoid membranes	52
Immobilization of thylakoid membranes	53
Experimental set-up	54
Experimentation and data treatment.	55
Results and discussion.	55

Acknowledgments.	59
References.	60
4. COMPARAISON INTER-LABORATOIRE DES RÉPONSES AUX HERBICIDES INHIBANT LE TRANSPORT PHOTOSYNTHÉTIQUE D'ÉLECTRONS.	71
5. CONCLUSION GÉNÉRALE.	78
RÉFÉRENCES	81
ANNEXE A: Résumé long en français du chapitre 2. Test <i>in vitro</i> de dépistage de la phytotoxicité, utilisant des thylacoïdes d'épinard immobilisés.	84
ANNEXE B: Résumé long en français du chapitre 3. Étude comparative de la sensibilité des thylacoïdes pour la détection d'herbicides, selon une immobilisation chimique ou physique des thylacoïdes	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
CHAPITRE 2	
1. Toxicants selected and the concentration of the stock solutions.	35
2. Comparison of the responses to different toxicants by immobilized thylakoid membranes and thylakoids in suspension	36
3. Responses of the photosynthetic electron transport chain to specific inhibitors (photosystem II inhibiting herbicides) and to herbicides with non-photosynthetic modes of action; comparison with a standardized algal bioassay and water quality guidelines.	37
CHAPITRE 3	
1. Slopes of the regression-lines obtained from the concentration-response curves	63

2. Comparison of herbicide 5 min-IC ₅₀ s generated by PVA-SbQ and BSA-Glu immobilized samples.	64
--	----

CHAPITRE 4

1. Comparaison de l'immobilisation PVA-SbQ et de l'immobilisation BSA-Glu (incubations 5 min et 20 min); réponses à des inhibiteurs du transport photosynthétique d'électrons.	74
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
CHAPITRE 1	
1. Représentation schématique d'un chloroplaste	9
2. Représentation schématique du transport d'électrons dans les thylacoïdes.	10
3. Mécanisme de génération du photocourant: la réaction de Mehler	11
CHAPITRE 2	
1. Schematic representation of the micro-electrochemical cell: (A) cell cover; (B) Plexiglas cover; (C) inlet and outlet for liquid sample; (D) plastic disc; (E) cell chamber (80 μ L); (F) electrodes disc; (G) platinum working electrode; (H) platinum counter electrode; (I) stainless-steel base with inlet (J) and outlet (K) for water circulation.	39

2. Inhibition of photocurrent in the presence of 0.5 mg/L atrazine at various Chl concentrations in the immobilized matrix and various incident light intensities. Each column represents the mean of duplicate measurements (coefficient of variation $\leq 5\%$). Other details are presented in Materials and Methods. 41

3. Stability of the immobilized samples stored in the dark at 4° C. For each storage time (except 12 days), two independant atrazine concentration-response curves were obtained with two different immobilized preparations (□, curve 1; ◆, curve 2). All the samples were obtained from the same thylakoid preparation. (A) Data points represent IC50s and error bars are 95 % confidence intervals obtained from probit analysis. (B) Data points represent the means and error bars are standard deviations of the controls photocurrent (n = 3-4). 43

4. (A) Control chart of atrazine 20 min-IC50s. Each IC50 and its 95 % confidence interval were obtained from probit analysis. (B) Control photocurrent associated with each test; the error bars are standard deviation of the mean (n = 3-4 except tests 13 to 18 where n = 5-6). 45

5. Concentration-response curves from herbicides triazines (atrazine, cyanazine) and triazinones (hexazinone, metribuzin); the atrazine concentration-response curve is from pooled data of tests 13 to 18 in the control chart. 47

CHAPITRE 3

1. Photocurrent generation by immobilized thylakoid samples: A, control with PVA-SbQ immobilization; B, inhibition in the presence of 0.12 mg/L diuron with PVA-SbQ immobilization; C, control with BSA-Glu immobilization; D, inhibition in the presence of 0.12 mg/L diuron with BSA-Glu immobilization. Upward arrow indicate light on and I is the photocurrent recorded. 65
2. Concentration-response curves obtained using PVA-SbQ immobilization (\square) or BSA-Glu immobilization (\blacklozenge) in the presence of cyanazine (A), diuron (B), and bromoxynil (C). Corresponding probit regression lines for cyanazine (D), diuron (E), and bromoxynil (F). 67
3. Comparison of the relative sensitivity of PVA-SbQ and BSA-Glu immobilized samples used in the electrochemical detection of nine herbicides. 69

CHAPITRE 4

1. Inhibition du photocourant par des herbicides de la famille des triazines. Les expériences ont été conduites avec des thylacoïdes immobilisés dans le PVA-SbQ et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (\bullet) et avec des thylacoïdes immobilisés dans le BSA-Glu et un temps de contact herbicide-

thylacoïdes de 5 min (□) et de 20 min (■)	75
2. Inhibition du photocourant par des herbicides de la famille des urées substituées. Les expériences ont été conduites avec des thylacoïdes immobilisés dans le PVA-SbQ et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (●) et avec des thylacoïdes immobilisés dans le BSA-Glu et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (□) et de 20 min (■).	76
3. Inhibition du photocourant par le propanil, le bromoxynil et le bentazone. Les expériences ont été conduites avec des thylacoïdes immobilisés dans le PVA-SbQ et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (●) et avec des thylacoïdes immobilisés dans le BSA-Glu et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (□) et de 20 min (■).	77

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Problématique

Les méthodes biologiques d'évaluation de la pollution aquatique servent à mesurer et comprendre les effets nocifs des substances toxiques sur les organismes vivants. Les «biotests» ou «bioessais» permettent d'évaluer la toxicité d'échantillons de produits chimiques, d'effluents ou de sédiments. Ces méthodes impliquent l'exposition d'un organisme déterminé (p. ex. bactérie, algue, daphnie) ou bien l'exposition de «matériel biologique» (p. ex. des cultures cellulaires eucaryotiques, des systèmes enzymatiques) à une série de dilutions d'un échantillon sous des conditions contrôlées en laboratoire.

Un seul organisme ou une seule méthode ne peuvent répondre aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. Il est reconnu qu'une série de bioessais s'avère nécessaire pour mettre en évidence divers effets toxiques chez des organismes représentatifs de différents niveaux trophiques (Bermingham et Boudreau, 1994; Langevin et al., 1990; Environnement Canada, 1992). Pour certaines substances toxiques, l'organisme le plus sensible peut être un invertébré ou un microorganisme, tandis que pour d'autres, ce sera un poisson ou une plante. Un type d'organisme ne peut permettre de prévoir la sensibilité d'un autre type d'organisme et

l'absence de corrélation de ce genre prouve qu'il est souhaitable d'effectuer des essais sur une variété d'organismes (Environnement Canada, 1992).

Jusqu'à la fin des années soixante-dix, les études écotoxicologiques consistaient principalement à déterminer les seuils de toxicité létale aiguë sur quelques organismes aquatiques. Or, les dommages sublétaux ont des conséquences qui peuvent affecter la croissance et la reproduction et se faire sentir au niveau des populations, entraînant ainsi des répercussions sur l'écosystème. Ainsi de nombreux biotests, indicateurs d'effets sublétaux des contaminants, ont été développés. Certains tests permettent d'examiner les réponses toxiques des niveaux cellulaire ou biomoléculaire où se font sentir les premiers effets toxiques. De plus, à ces niveaux de complexité biologique, les réponses sont communes chez plusieurs espèces différentes (Langevin et al., 1990). Par ailleurs, l'utilisation de ces tests devrait aussi permettre d'améliorer notre compréhension des modes d'action des substances toxiques (Lovett Doust et al., 1994).

Plusieurs polluants retrouvés dans l'eau sont de forts inhibiteurs de la photosynthèse. Le processus photosynthétique étant primordial chez les autotrophes, les polluants qui affectent ce processus s'attaquent aussi à la viabilité des espèces végétales. De plus, les producteurs primaires étant à la base de la chaîne alimentaire, une perturbation à ce niveau dans un écosystème se répercute aux niveaux trophiques supérieurs. Ainsi, les réactions impliquées dans la phase lumineuse de la photosynthèse (le transport photosynthétique d'électrons, la translocation des protons et la synthèse d'ATP) sont les cibles premières d'environ la moitié de tous les herbicides utilisés (Kleczkowski, 1994). Trois grandes familles d'herbicides affectent directement le mécanisme du transport photosynthétique d'électrons: ce sont les dérivés urées, triazines et phénols (Hatzios, 1994;

Trebst, 1980). Les dérivés triazines ont une grande importance commerciale (Parry, 1989). Plusieurs cations métalliques bivalents (cadmium, plomb, cuivre, mercure, zinc et nickel) sont aussi des inhibiteurs du transport photosynthétique d'électrons (Trebst, 1980).

L'élaboration d'un test à base de membranes photosynthétiques tel que proposé dans cette étude, offre la possibilité d'évaluer les effets des toxiques au niveau du transport d'électrons de la photosynthèse. À ce niveau biochimique, les réponses aux polluants sont communes chez toutes les espèces végétales et chez les cyanobactéries, le mécanisme photosynthétique ayant été hautement conservé au cours de l'évolution.

Plusieurs bioessais reconnus sont coûteux et demandent un temps d'exécution considérable. Les avantages de cette approche résident aussi dans sa rapidité, sa simplicité et son faible coût.

1.2 Notions de photosynthèse

Le rayonnement solaire est la source première d'énergie pour tous les organismes de la biosphère. C'est par la photosynthèse que l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique.

Les plantes et les cyanobactéries utilisent le mécanisme de la photosynthèse pour fabriquer des glucides à partir de l'eau et du CO_2 , libérant de l'oxygène dans l'atmosphère. Les glucides produits par la photosynthèse servent ensuite de source d'énergie pour la plante elle-même mais aussi servent pour tous les autres organismes non-photosynthétiques par le biais des chaînes alimentaires.

La photosynthèse a lieu dans les chloroplastes (Fig.1). Ceux-ci sont entourés d'une double membrane: la membrane externe et la membrane interne. La membrane externe est

très perméable aux métabolites de petits poids moléculaires tandis que la membrane interne est presque imperméable et c'est au moyen de perméases qu'elle ajuste le déplacement des métabolites entre l'extérieur et l'intérieur de l'organite. La membrane interne se replie vers l'intérieur pour former la membrane thylacoïdienne. Celle-ci forme de petites vésicules aplaties appelées thylacoïdes. Les thylacoïdes sont souvent empilés et forment des grana. La composition lipidique particulière de la membrane thylacoïdienne lui procure une grande fluidité. Le milieu liquide à l'intérieur du chloroplaste s'appelle le stroma; il contient les enzymes nécessaires à la fixation du CO_2 et à la synthèse des glucides.

La photosynthèse s'effectue en deux phases distinctes:

1. La phase lumineuse au cours de laquelle l'énergie lumineuse est utilisée pour produire du NADPH et de l'ATP.
2. La phase obscure indépendante de la lumière où le NADPH et l'ATP sont utilisés pour la synthèse des glucides à partir de la réduction du CO_2 atmosphérique.

Les réactions de la phase lumineuse se déroulent dans la membrane thylacoïdienne. Les réactions de la phase obscure se déroulent dans le stroma par une série de réactions enzymatiques.

Seulement le mécanisme de la phase lumineuse de la photosynthèse sera décrit ci-dessous puisqu'il est le seul mécanisme impliqué dans cette étude. Les réactions de la phase lumineuse comprennent la collecte de lumière par les pigments et le transport d'électrons conduisant à la formation de NADPH. Le transport d'électrons est couplé à l'établissement

d'un gradient de protons (Δ pH) à travers la membrane du thylacoïde, ce gradient servant de source d'énergie à la synthèse d'ATP (Fig. 2).

Les protéines membranaires des thylacoïdes sont réparties en quatre complexes protéiques: le photosystème II (PSII), le cytochrome b_6f , le photosystème I (PSI) et l'ATP synthétase. Il y a deux photoréactions qui agissent en série, une au niveau du PSII et une au niveau du PSI. Chaque photosystème possède un complexe collecteur de lumière (formé de plusieurs chlorophylles) qui recueille les photons pour les acheminer aux chlorophylles des centres réactionnels des photosystèmes, soit le P680 pour le PSII et le P700 pour le PSI.

Ainsi l'énergie absorbée au centre réactionnel P680, entraîne la perte d'un électron par cette chlorophylle et son transfert par une série de transporteurs vers la face stromale de la membrane jusqu'à une plastoquinone située au site Q_B . La molécule de chlorophylle oxydée devient un oxydant puissant capable d'arracher des électrons à l'eau: à la face lumineuse de la membrane, il se produit la photolyse de l'eau avec production de H^+ et d'oxygène.

La plastoquinone réduite au site Q_B , diffuse dans la membrane et se joint à un bassin de plastoquinones servant d'une part de navette entre le PSII et le complexe cytochrome b_6f , et d'autre part servant aussi à pomper des H^+ du stroma vers la lumière des thylacoïdes. Les électrons passent ensuite du cytochrome f à la plastocyanine (PC), un transporteur d'électrons soluble dans la lumière des thylacoïdes. La plastocyanine donne ses électrons au PSI qui renferme la chlorophylle P700. L'énergie absorbée par le PSI lui permet de céder ses électrons aux transporteurs suivants et ils atteignent finalement la ferrédoxine (Fd), une

protéine soluble située à la face stromale. Le NADP^+ est alors réduit en NADPH par une enzyme.

De très nombreux herbicides inhibent le transport d'électrons au niveau du site de réduction de la plastoquinone, soit le site Q_B . Le site Q_B est le site d'action des dérivés urées, phénols et triazines.

1.3 Principe du microtest de phytotoxicité

Une méthode d'extraction des thylacoïdes permet d'obtenir toute la chaîne de transport jusqu'au transporteur précédant la ferrédoxine. Cette dernière est partiellement lessivée par le processus d'extraction car il s'agit d'une protéine soluble dans le stroma.

Les thylacoïdes sont utilisés dans une microcellule électrochimique (volume de la chambre de mesure de 80 μL) pour produire un photocourant (Mimeault et Carpentier, 1988). L'effet inhibiteur d'un polluant est suivi par la diminution du photocourant.

Le mécanisme de génération du photocourant est basé sur la réaction de Mehler que l'on appelle aussi transport pseudo-cyclique d'électrons (Fig. 3). Lorsque les thylacoïdes sont éclairés, les électrons sont transportés par la chaîne de transport et c'est l'oxygène présent dans le milieu qui accepte les électrons du côté réducteur du PSI, la Fd n'étant plus présente. L'oxygène est ainsi transformé en ion superoxyde O_2^- qui par dismutation spontanée et/ou enzymatique, se transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Un potentiel approprié est appliqué aux électrodes de la cellule et le peroxyde d'hydrogène cède alors ses électrons à l'électrode de travail, produisant un photocourant (Goetze et Carpentier, 1990; Agostiano et al., 1992). Comme pour la photosynthèse *in vivo*, l'eau est le donneur

d'électrons et il se produit un dégagement d'O₂ du côté oxydant du PSII, ce qui contribue à stabiliser la concentration d'oxygène dissous dans la cellule.

Le photocourant obtenu est une mesure impliquant toute la chaîne. Une inhibition à n'importe quel niveau du transport photosynthétique d'électrons peut donc être détectée.

1.4 Objectifs de la recherche

Utilisant les thylacoïdes en suspension, des travaux antérieurs ont démontré que l'approche électrochimique constituait une méthode adéquate pour la biodétection de toxiques (Chartrand, 1992). Par contre, la fragilité du matériel biologique demeurait un facteur limitant dans la perspective d'une application biotechnologique. À cet effet, il a été démontré que l'immobilisation des thylacoïdes dans une matrice albumine-glutaraldéhyde protégeait et stabilisait leur activité biologique, facilitant la manipulation des échantillons autant sous des conditions d'entreposage que de travail (Loranger, 1992).

Ce projet de recherche visait la mise au point d'un test de dépistage de polluants phytotoxiques, utilisant les thylacoïdes immobilisés comme outil de détection dans une microcellule électrochimique (Chapitre 2). Les objectifs spécifiques étaient: (1) d'optimiser la réponse des thylacoïdes immobilisés dans la microcellule électrochimique; (2) de caractériser la reproductibilité du microtest; (3) d'obtenir les réponses toxiques d'herbicides appartenant à différentes classes chimiques; (4) de comparer ces réponses avec celles d'un bioessai de phytotoxicité reconnu.

Ce projet s'est aussi enrichi d'une étude complémentaire portant sur la comparaison de deux approches d'immobilisation des thylacoïdes (Chapitre 3). L'immobilisation albumine-glutaraldéhyde, une immobilisation «chimique» comportant des liaisons

covalentes avec les protéines membranaires des thylacoïdes, a été comparée à une immobilisation «physique» sans liens covalents avec le matériel biologique. Les niveaux de détection de neuf herbicides ont été confrontés selon les deux techniques d'immobilisation du matériel biologique.

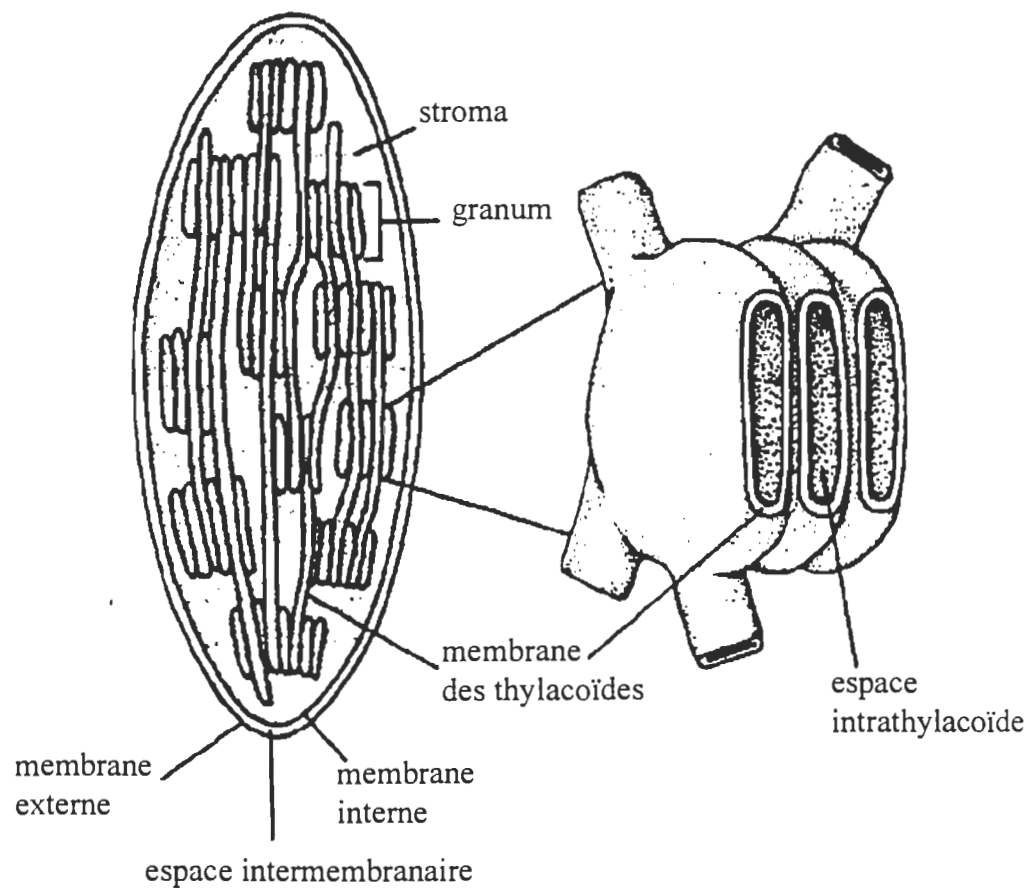


Figure 1. Représentation schématique d'un chloroplaste. D'après Alberts et al., 1989.

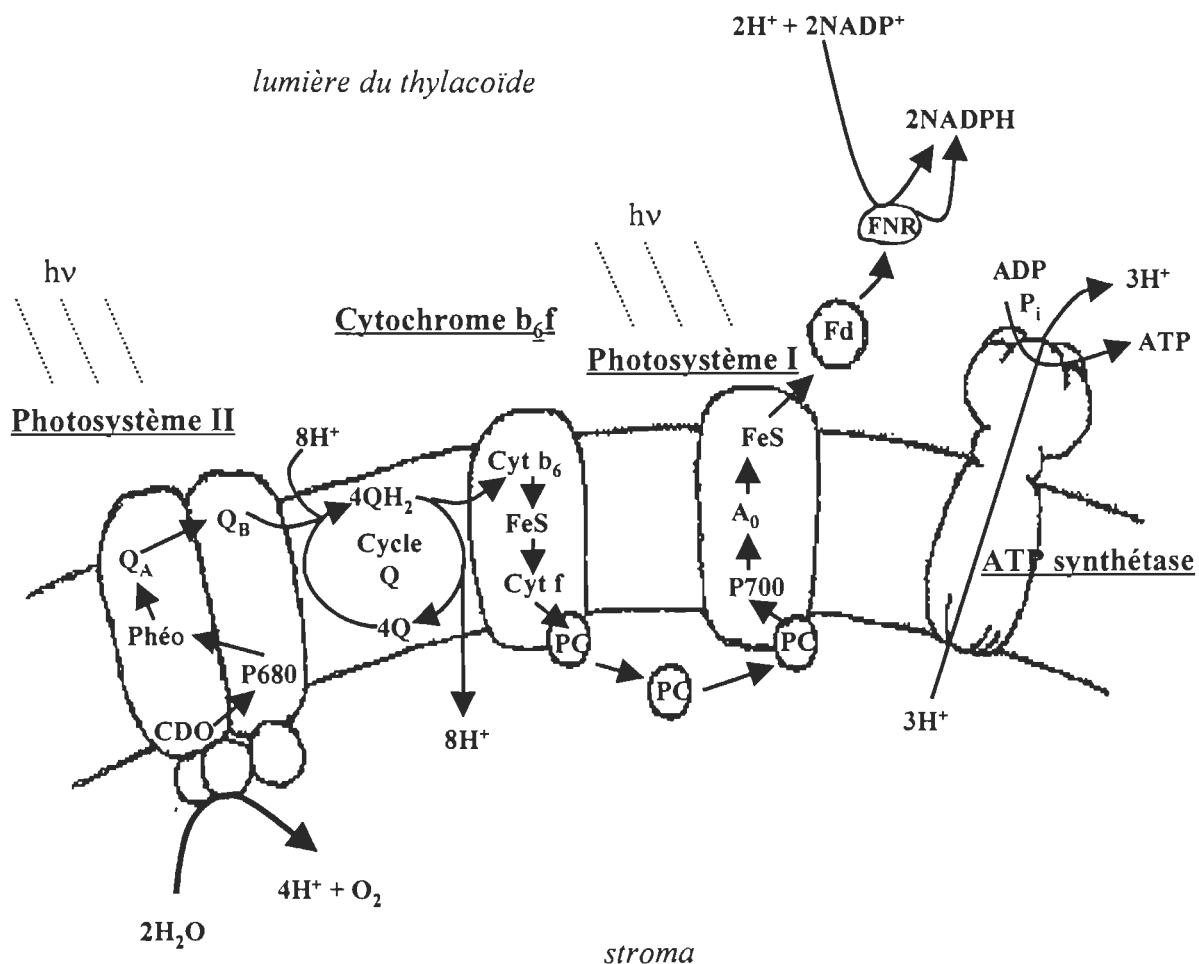


Figure 2. Représentation schématique du transport d'électrons dans les thylacoïdes. D'après Voet et Voet, 1995.

CDO=complexe de dégagement d'oxygène, P680=centre réactionnel du PSII, Phéo=phéophytine, Q_A =accepteur primaire d'électrons du PSII, Q_B = accepteur secondaire d'électrons du PSII, QH_2 =plastoquinol, Q=plastoquinone, cyt b_6 =cytochrome b_6 , FeS=complexe fer-soufre, Cyt f=cytochrome f, PC=plastocyanine, P700=centre réactionnel du PSI, A_0 =accepteur d'électrons du PSI, Fd=ferrédoxine, FNR=ferrédoxine NADP $^+$ réductase, NADP $^+$ /NADPH=nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé/réduit, P_i =phosphate inorganique, ADP=adénosine diphosphate, ATP=adénosine triphosphate.

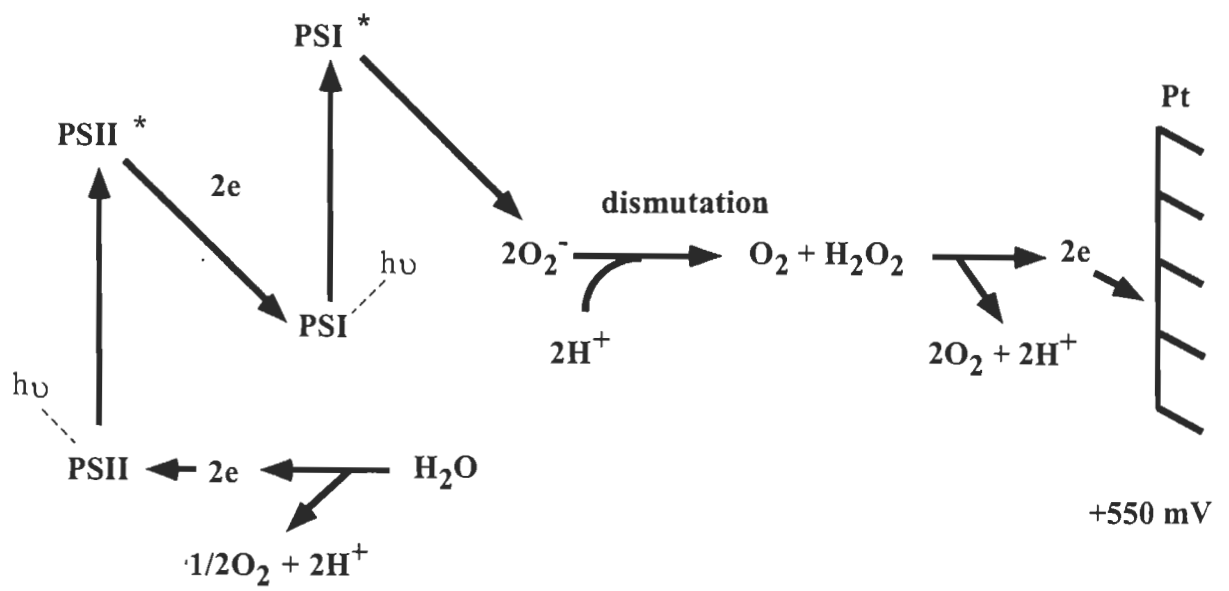


Figure 3. Mécanisme de génération du photocourant: la réaction de Mehler.

CHAPITRE 2

IN VITRO PHYTOTOXICITY SCREENING TEST USING IMMOBILIZED SPINACH THYLAKOIDS

DENISE LABERGE†, JOSÉE CHARTRAND†, RÉGIS ROUILLON‡ AND ROBERT CARPENTIER† *

†Groupe de Recherche en Énergie et Information Biomoléculaires,

Université du Québec à Trois-Rivières,

C.P. 500, Trois-Rivières (Québec), Canada, G9A 5H7.

‡Groupe d'Études et de Recherches Appliquées Pluridisciplinaires, URA CNRS 461,

Université de Perpignan, Centre de Phytopharmacie,

52 ave de Villeneuve, 66860 Perpignan, France.

* To whom correspondence may be addressed.

Abstract — Several pollutants found in water inhibit the photosynthetic electron transport chain, and therefore affect the growth of phytoplankton and aquatic plants. In this study, thylakoid membranes isolated from spinach leaves were used in a micro-electrochemical cell to generate photocurrent. The toxic effect of an inhibitor is observed by a decrease in the photocurrent. To improve the stability of their biological functions, the thylakoid membranes were immobilized in an albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix. The developmental work of this phytotoxicity test was done by using the herbicide atrazine as reference toxicant. Results on reproducibility were in the range generally accepted for standardized bioassays. The phytotoxicity of herbicides from various chemical classes including photosynthetic and non-photosynthetic inhibitors was evaluated. Toxicity responses of the immobilized thylakoid test to photosynthetic inhibitors compared favorably with literature data for the algal growth inhibition test using *S. capricornutum*. The detection capabilities of the photosynthetic micro-assay for cyanazine, metribuzin, diuron, and propanil met the recommendation for the water quality guidelines for raw water. Characteristics of this in vitro approach such as rapidity, experimental simplicity, and cost-effectiveness are also discussed.

Keywords—Herbicides Phytotoxicity Photosynthesis electron transport
In vitro toxicity test Biosensor

INTRODUCTION

Biological tests for assessing aquatic pollution are aimed at measuring and understanding the noxious effects of toxicants on living organisms. Generally, multitrophic testing is conducted with whole organisms from different taxonomic groups [1, 2]. However, this approach is expensive and time-consuming since for most commercial laboratories the delay for the production of a written report for the assays is 3 to 5 weeks [3]. There is a need for low-cost techniques enabling rapid detection of toxic effects of effluents or chemical samples. These techniques could be used to indicate where in depth investigations should be focused.

Toxic chemicals exert their effects by interacting with biological systems at the cellular or biomolecular level [4]. At the biomolecular level, the mode of action of toxicants is similar among many species [5]. The photosynthetic process has been well conserved through evolution and is largely similar from cyanobacteria to vascular plants. Thus, a toxic chemical affecting the photosynthetic process is potentially harmful for all the plant species. The photosynthetic electron transport chain is the target of several pollutants found in water, among them herbicides from agricultural land runoffs. Hence, the light reactions of photosynthesis constitute the primary target of about half the herbicides used [6].

A micro-electrochemical cell using isolated thylakoid membranes to generate photofocurrent has been developed [7]. In this cell, the absorbed light energy is used by the photosynthetic membranes where whole chain electron transport results in the reduction of oxygen to hydrogen peroxide which is oxidized at a platinum electrode [8, 9]. Inhibitors of

reactions along the photosynthetic electron transport chain induce a decrease of the photocurrent produced.

In this study, thylakoid membranes isolated from spinach leaves were immobilized in an albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix because the short lifetime of isolated thylakoids constitutes a limiting factor for biotechnological applications [10]. Other immobilization strategies were investigated by Cocquempot et al [11], but immobilization of thylakoids in an albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix provided a better preservation of the native thylakoid activity, and maintained a greater functional stability. The optimal conditions for utilization of these photosynthetic membranes in the micro-electrochemical cell in view of a phytotoxicity screening test were established. Reproducibility and detection limits of the technique were investigated using atrazine as reference toxicant and the response to various other toxicants was obtained. The detection capabilities of the photosynthetic micro-assay were compared with literature data for the algal growth inhibition test using *S. capricornutum*, and also with water quality guidelines.

MATERIALS AND METHODS

Toxic products

The toxic products used in this study are listed in Table 1. The last resuspension buffer used for the preparation of thylakoids (Tes buffer, see below) was adequate as the assay buffer and for the preparation of the toxicant stock solutions. The poor aqueous solubility of some

pesticides required incorporation of ethanol in the stock solutions. Prior to testing showed that added ethanol had no toxic effect within the weak working concentrations used.

Preparation of thylakoid membranes

Thylakoid membranes were isolated from 100 g deveined spinach leaves. Spinach was purchased locally. All steps were performed at 4° C under green light. Spinach leaves were homogenized (30 s at the maximal speed of a Waring blender) in 20 mM Tes-NaOH (pH 7.5), 330 mM sorbitol, and 5 mM MgCl₂ at 0° C. The homogenate was filtered through several layers of cheesecloth, and the filtrate was centrifuged at 2500 g for 1 minute (Sorval centrifuge, SS-34 rotor). The pellet was suspended in a hypotonic solution (1:20 of the above Tes buffer) freeing thylakoid fragments from broken chloroplasts. The solution was homogenized in a Wheaton tube, and the thylakoid membranes were collected as a pellet at 4000 g for 1 minute. The thylakoid membranes were resuspended in 50 mM Tes-NaOH pH 7.5, 330 mM sorbitol, 2 mM MgCl₂, and NH₄Cl 1mM. The amount of thylakoid membranes was quantified by measuring chlorophyll (Chl) concentration according to the spectrophotometric procedure of Porra et al. [12]. The membranes were diluted with the resuspension buffer at a Chl concentration of 2 mg/mL. Aliquots were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80° C until use.

Immobilization of thylakoid membranes

The immobilization procedure used was similar to that described by Thomasset et al. [13]; for a detailed description see [14]. All steps were performed at 4° C under green light. The procedure consisted of mixing 1.65 mL of 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.1, 1.25 mL of 20 % w/v bovine serum albumin (BSA, fraction V from Sigma) solution, and 1 mL of 1.5 % glutaraldehyde (certified grade, 25 % in water from Fisher) solution. The mixture was incubated for 2 minutes, then 0.6 mL of thylakoid membranes suspension was added, followed by 3-4 s agitation using a vortex mixer. The thylakoid suspension was diluted in resuspension buffer to obtain the desired Chl concentration in the immobilization matrix. The immobilized thylakoids used for testing usually contained 250 µg Chl/mL (unless otherwise indicated).

The immobilization mixture was immediately divided into 80 µL aliquots in Petri dishes. With a micro-pipet tip, the samples were distributed to fit a circle of ~1 cm in diameter; this corresponds with the diameter of the measuring chamber in the micro-electrochemical cell and enables the sample to be in intimate contact with the electrodes. The samples were frozen at -20° C for 2 hours (to obtain an insoluble proteic matrix, see [15]) and then slowly thawed and kept in the dark at 4° C until use. The samples, which are small sponge-like discs, were covered with the resuspension buffer preventing them to dry.

Experimental set-up

The electrochemical cell is composed of two platinum flag electrodes, the working and counter electrodes (Fig. 1). The counter electrode acted also as the reference electrode. The light beam from a 150 W quartz halogen illuminator (Microview Canada, Thornhill)

was guided onto the top of the cell through a fiber-optic guide. The light intensity striking the sample and measured through the Plexiglas cover was 1900 W/m^2 . The cell base was kept at 22° C by a water circulation. A potentiostat (Princeton Applied Research model 362) imposed a potential of 550 mV at the working electrode, and the current was monitored on a chart recorder.

Experimentation and data treatment

To ensure the best conditions, experimentation was done under green light, and thylakoid suspensions or immobilized thylakoids were kept on ice. The cell chamber was filled with a suspension of thylakoid membranes diluted to $20 \mu\text{g Chl/mL}$ in the final resuspension buffer (without BSA). Before the electrochemical measurements, the porous disc of immobilized thylakoids was placed for 2 minutes on a chromatography paper (Whatman Chromatography paper, 3MMChr) to remove the resuspension buffer together with unreacted glutaraldehyde if present. The disc was then introduced in a glass tube and incubated in 1 mL of a given test solution for 15 minutes at 4° C . The disc was transferred to the micro-electrochemical cell, the potential was applied and after 5 minutes of equilibration, the illumination was turned on to record the photocurrent. The strong incident light induced on the platinum working electrode a low but measurable photoreaction producing a weak photocurrent (around $0.013 \mu\text{A}$) which is also observed without thylakoids in the electrochemical cell [9]. This photoeffect was subtracted from all the readings. The resulting photocurrents were expressed as percent inhibition relative to the controls.

The toxicity of each chemical was evaluated by constructing a concentration-response curve. The toxicant concentration that inhibited 50 % of the control photocurrent (IC₅₀) and the Lowest Observable Effect Concentration (LOEC) were determined from this curve. This was accomplished by conducting measurements at different concentrations. To keep the test as brief as possible, the concentration measurements were performed in duplicate accepting a maximal difference of 10 %, otherwise a third measurement was made. Five replicates were systematically measured with concentrations approaching the detection limits. Throughout the test, five or six control responses were obtained.

IC₅₀ values were calculated using probit analysis [16]. For the determination of the LOEC, the responses from concentrations approaching the detection limits were compared with control in a Student's t-test between means at statistical significance of $\alpha = 0.05$.

IC₅₀s for the construction of the reference toxicant (atrazine) control chart were obtained from 5 data points curves corresponding to 5 concentrations (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/L) for all the atrazine tests. In these 5 data points curves, each data point was the mean of duplicate or triplicate, and the control points were the mean of 3 or 4 replicates.

RESULTS

Establishing the optimal conditions

Previous works in our laboratory reported the use of 250 μg Chl/mL in immobilized thylakoid membranes samples [17-19]. In the present study, some of the test conditions had

been changed, and it was important to reassess the optimal concentration. As explained below, it was found that 250 $\mu\text{g Chl/mL}$ was still the optimal concentration (Fig. 2). The photocurrent inhibition at various Chl concentrations using 0.5 mg/L of atrazine at a light intensity of 1900 W/m^2 is reported in Figure 2. The pattern of inhibition, i. e. highest at 250 $\mu\text{g Chl/mL}$, was similar for the other light intensities investigated (data not shown). Previous studies with thylakoid membranes in suspension illustrated that the test was more sensitive to the presence of phytotoxic compounds at lower Chl concentrations because less inhibitor molecules were needed when less photosystems were present [17]. Although this explanation holds true for the slight increase of inhibition observed going from 300 $\mu\text{g Chl/mL}$ to 250 $\mu\text{g Chl/mL}$ with our immobilized samples, decreasing the concentration to 200 $\mu\text{g Chl/mL}$ or 150 $\mu\text{g Chl/mL}$ resulted in lower photocurrent inhibitions (Fig. 2). One possible interpretation would be that we are out of range of the optimal Chl concentration for the immobilization procedure which is based on fixed proportions of BSA, glutaraldehyde, and Chl. The stability of the immobilized thylakoids is ensured by a network of covalent bonds involving free NH_2 groups of membranes proteins. The protein BSA is used to wrap the thylakoids, and protect them against excessive crosslinking with glutaraldehyde. At a Chl content of less than 250 $\mu\text{g/mL}$, the thylakoids were probably excessively coated by BSA making them scarce in the matrix and hence difficult to reach by the inhibitors.

The response of 250 $\mu\text{g Chl/mL}$ samples at four light intensities are shown in Figure 2. The response obtained at the two lowest intensities (1100 and 1900 W/m^2) were similar, but the sensitivity diminished with further increases in light intensity. Moreover, the two

strongest light intensities enhanced the photoeffect on the platinum electrode, an undesirable phenomenon that should be kept as low as possible.

To ensure an adequate range of photocurrents with a concentration series of an inhibitor, it was better to have a control photocurrent as high as possible. An incident light intensity of 1900 W/m^2 was further used because the control photocurrent ($0.44 \mu\text{A}$) was higher than the one at 1100 W/m^2 ($0.37 \mu\text{A}$).

The stability of immobilized thylakoids was examined in terms of IC_{50} values obtained for two atrazine concentrations and the control photocurrent over a 15 days storage period at 4°C in the dark (Fig. 3). The samples kept their full stability for the storage times 4, 9, and 12 days. However, there was a needed period of sample stabilization of 2 days as illustrated by the abnormally high IC_{50} and low control photocurrent values obtained after a storage period of 1 day (Fig. 3A and B). The reason for this delay is not understood, but such a phenomenon has not been reported with thylakoids in suspension used within short time periods after being thawed. This observation suggests that some rearrangements of the immobilized thylakoid matrix may take place right after immobilization.

By 15 days, IC_{50} s were increasing and the control photocurrents were lower (Fig. 3A and B). The 15 day-old samples showed signs of microbial contamination, but the use of chemicals to prevent such a contamination should be avoided as they can possibly interfere with the results. All the following experiments were conducted with samples stored from 3 days to 12 days.

The response to a variety of toxicants was verified to ensure that the immobilization of the thylakoid membranes did not impair their capability of detection (Table 2). For all the herbicides tested, whether they were photosynthetic inhibitors or not, the IC₅₀s from immobilized and suspension samples were practically the same. In contrast, immobilized thylakoids were one order of magnitude less sensitive to the copper ions than the thylakoids in suspension. For pentachlorophenol, the IC₅₀ for the immobilized samples could not be evaluated because a concentration higher than 50 mg/L affected the electrodes. However, comparison between the LOEC of the immobilized thylakoids and the IC₅₀ of the thylakoid suspension revealed the same order of magnitude (Table 2). Sodium dodecyl sulfate is a detergent that disrupts biological membranes. The protective role brought by the immobilization is well emphasized by the poor sensitivity of immobilized samples to this chemical.

As stressed before, with thylakoid suspensions, the sensitivity of the test improved by decreasing Chl concentration [17]. It is interesting to note that the sensitivity toward the toxicants tested was similar (except for sodium dodecyl sulfate) in both the immobilized thylakoids and the thylakoid suspension even when the Chl concentration was more than ten times greater for the immobilized thylakoids. This observation was reported before but comparative work had been done with atrazine and diuron only [17].

Reproducibility of the thylakoids phytotoxicity test

Atrazine was chosen as the reference toxicant to construct a phytotoxicity response control chart (Fig. 4A). The tests were spread over one year of experimentation. The mean

(X) and standard deviation (SD) of nineteen IC₅₀ data points were used to define a representative range of variability in the phytotoxicity test [20]. Concentrations that equal two times the standard deviation above and below the mean ($X \pm 2SD$) represent the 95 % confidence limits and are also the warning limits of the test. With the exception of the second thylakoid preparation (see Fig. 4A), the biological material responded fairly close to the IC₅₀s. All together, the nineteen tests produced a coefficient of variation (% CV = $100 \text{ SD} / X$) of 23 % and without test 8 in the calculation, the CV is lowered to 18 %.

As specified, aliquots of isolated thylakoids were kept at -80° C and taken as needed for immobilization (see Materials and Methods). Two tests on the control chart were conducted with samples immobilized from a 8 week old frozen thylakoid suspension (Fig. 4A, tests 10 and 14), demonstrating a good preservation of frozen thylakoids.

Only preparations of thylakoids 5 to 7 were used to obtain the phytotoxic response to other toxicants. These preparations were first tested with the reference toxicant to verify that they qualified within the confidence limits of the control chart (Fig. 4A).

Control photocurrent associated with each test was usually around 0.5 μA (Fig. 4B). The higher photosynthetic activities found with thylakoid preparations 5 to 7 (tests 15 to 19), did not have an influence on the IC₅₀ of atrazine.

Responses to different classes of herbicides

Examples of concentration-response curves generated by triazines and triazinones are displayed in Figure 5, showing also the typical sigmoid shape encountered in toxicity

testing. Depending on the herbicide, curves reached only 80 to 90 % inhibition. This was not observed with thylakoid suspensions as they reached nearly 100 % inhibition at high concentrations of inhibitor (unpublished result). Nevertheless, this unexplained effect was neglected because only the middle and lower parts of the concentration-response curves were of interest. Considering all the toxicants assessed, a concentration giving 10 % inhibition had always produced photocurrent significantly different from control. It was sometimes possible to accept a lower level of inhibition as with cyanazine for example, the LOEC came from as low as 6 % inhibition.

Representative herbicides of different classes were chosen among those of current agricultural use [21]. Moreover, triazines and substituted ureas are especially of concern because of their high leaching potential [22]. In fact, they are widely reported in the literature as contaminants of freshwater systems. The specific inhibitors of the photosynthetic electron transport chain and herbicides of other modes of action presented large differences between their phytotoxic responses (Table 3).

IC50s of all the photosynthetic inhibitors were higher in the thylakoid test than in the algal test (Table 3). On the other hand, with an exposure time of only 20 minutes, the LOECs for immobilized thylakoids reached a sensitivity comparable to the IC50s-96 h of the algal growth test. We observed also the same overall pattern of inhibition with both the thylakoid and algal tests: triazines, substituted ureas, and propanil were highly toxic and bromoxynil was moderately toxic. Bromoxynil was around two orders of magnitude less toxic than the other herbicides. It was demonstrated that albumin could partly prevent inhibition by phenol derivative [23]. This could be one explanation for the poorer sensitivity observed with bromoxynil in the thylakoid test.

The LOECs of cyanazine, metribuzin, diuron, and propanil were able to meet the recommendation for the water quality guidelines for raw water (for drinking water supply) [24].

Examination of the IC50s and LOECs of herbicides with non-photosynthetic modes of action showed that they had practically no effect on the photosynthetic electron transport chain (Table 3). 2,4-D acts by mimicking the activity of natural plant-growth regulators, glyphosate is an inhibitor of amino acid biosynthesis, and metolachlor is an inhibitor of lipid synthesis [25]. The results obtained with the thylakoid test was expected but we wanted to establish how well immobilized thylakoids discriminates between photosynthetic and non-photosynthetic types of herbicides. With the thylakoid test, the LOECs for the photosynthetic types of herbicides were around five orders of magnitude lower than those for the non-photosynthetic types of herbicides (Table 3).

DISCUSSION

In this study, thylakoid membranes constituted the sensing element capable of toxicant detection in a micro-electrochemical cell. The inhibition observed is based on the binding of these toxicants to specific thylakoid components involved in the light-driven electron transport reactions.

The inexpensive raw material used was locally bought spinach leaves. Moreover, the isolation procedure of thylakoids from 100 g of leaves generated enough biological material for about one hundred concentration-response curves. The frozen (-80° C)

suspension of thylakoids kept well for up to 8 weeks, avoiding the task of repetitive isolations.

Either from freshly isolated or frozen suspensions, the thylakoids were immobilized in an albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix. This procedure had the goal to improve the stability of the thylakoids biological functions. With atrazine as inhibitor, our results showed that the immobilized samples could give stable photocurrents and similar IC₅₀s over a 10 day period when stored in the dark at 4° C. Thylakoids in suspension are only stable for a few hours under the same conditions. The possibility of long-term storage of the thylakoids (either in suspension at -80° C or immobilized at 4° C) ensures a continuous supply of testing material. In comparison, conventional phytotoxicity assays require the task of maintaining algal or plant stock cultures.

An overview with a variety of herbicides showed that the sensitivity of detection was not affected by the immobilization procedure (Table 2). However, the only metal ion tested, Cu²⁺, gave a IC₅₀ an order of magnitude higher with immobilized samples than with suspension samples. Perhaps, the experimental conditions were optimal for herbicide detection but not for metals because the buffer used may have an influence on metal detection. Previous work with thylakoids in suspension showed that they were less sensitive to copper in a phosphate test buffer because this buffer tends to precipitate metallic cations (unpublished result). Although Tes buffer was used as the test buffer in the present study, phosphate buffer was included in the immobilization mixture. Nevertheless, the phosphates may have interfered in the Cu²⁺ detection with immobilized thylakoids. Renganathan and Bose [26] reported that inhibition of photosynthetic electron transport by copper was dependent on the buffer used.

It was initially thought that the isolation procedure may account for the largest part of variability in the test. However, the control chart of the test (Fig. 4A) illustrated that the IC50s stayed fairly constant with different preparations (except preparation 2). Upon examination of the span of IC50s obtained and with more tests added to the control chart we could possibly adopt narrower warning limits. In this way, defective thylakoid preparations, as it seemed to be the case of preparation 2 in this study, would be rejected.

Altogether the tests produced a CV of 23 %. The level of reproducibility was in the range generally accepted for standardized bioassays. For bioassays on whole organisms (e. g. algae, fish, invertebrates) with a reference toxicant, it was reported that a CV of 20 % is quite acceptable, yet it is even recognized that a CV of 30 % may be more realistic for some tests [20]. The variability of the toxicity test using luminescent bacteria *Photobacterium phosphoreum* (Microtox) is considered low compared with other aquatic toxicity tests. For example, according to different studies, the CVs with a reference toxicant were between 10 and 20 % [2]. The microplate toxicity assay with *Selesnastrum capricornutum* is now a recommended biological test method [27]. In prior steps of protocol optimization, the microplate toxicity assay had been subjected to an intercalibration exercise [28]. Three ecotoxicological laboratories produced CVs ranging from 11.7 to 32.1 % for CdCl₂ and from 25.4 to 40.8 % for phenol.

Phytotoxic responses from herbicides of different modes of action demonstrated that the thylakoid test offered a great specificity toward inhibitors targetting photosystem II (Tables 3). These herbicides inhibited the thylakoids at concentrations 5 orders of magnitude lower than the other herbicides. In fact, the LOECs for the non-photosynthetic

inhibitors (2,4-D, glyphosate and metolachlor) were so high that they were no longer environmentally relevant[29].

In this study, the order of sensitivity among the chemical class of triazines was cyanazine > hexazinone = metribuzin > atrazine (Table 3). In a comparative study with the unicellular green algae *Selesnastrum capricornutum* and the vascular monocot *Lemna minor*, only *Selenastrum* showed the same order of sensitivity to cyanazine, metribuzin and atrazine [30]. Although we consider that our model is closer to an unicellular algae than an aquatic plant, wide inter-species variations in the sensitivity to herbicides have been reported within the algae [29,30]. Hence, the immobilized thylakoid test developed here could prove useful in identifying the mode of action of unknown liquid samples on photosynthesis without bias from other physiological processes.

In the micro-electrochemical cell, the photocurrent is a measure of the whole electron transport chain [8, 9]. The synchronized activities of both photosystems are necessary in the production of the photocurrent. This enables the detection of inhibitors acting at any location along the electron transport chain. Nevertheless, some chemicals may cause interference problems. For example, herbicides from the bipyridylum family (e. g. diquat, paraquat) catalyze the formation of hydrogen peroxide, the species involved in the generation of photocurrent by thylakoids. Instead of inhibition, they would provoke an increase of photocurrent. With thylakoids in suspension, it was observed that the herbicide paraquat increased the photocurrent at high Chl concentration (200 µg/mL) but had no effect at low Chl concentration (10 µg/mL) (unpublished result). However, the effects of bipyridylum herbicides will have to be investigated with immobilized thylakoids since immobilization led to a lower concentration of photochemically active photosystems.

Indeed, it was reported that immobilization, while improving the stability of thylakoids, results in about 40 % loss of photosynthetic activity [14, 17]. Thus, the “effective” Chl concentration responsible for toxicants detection in our studies was then less than 250 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, Pratt et al [31] reported that the herbicide diquat is rapidly bound to organic matter in the field and rarely persists in the water column.

Other approaches to monitor the activity of the electron transport chain are mainly based on Chl *a* fluorescence and oxygen evolution measurements. The advantage of an electrochemical approach over fluorescence is that interpretation is more complicated with fluorescence assays; according to the nature of inhibitors, fluorescence may increase or decrease. On the other hand, oxygen evolution measurements require the addition of artificial electron acceptors that could interfere with the toxicants to be detected. Furthermore, with the oxygen evolution approach electron transport measurements are usually restricted to photosystem II while the electrochemical technique used here measures the whole chain electron transport reactions. Measurements with the electrochemical cell are easily performed and rapid (5 min), requiring only small volumes of toxic solutions. Experimental simplicity of the protocol is also an attractive characteristic of this approach.

Even with a very short exposure time to the toxicant (20 min), the immobilized thylakoid test gave toxicity responses to specific inhibitors comparable to algal growth inhibition tests (96 h). The immobilized thylakoid test may provide a useful screening tool for toxic chemicals that target specifically on photosynthetic processes.

Acknowledgement — We thank the Ciba-Geigy Corporation for donation of atrazine. D. Laberge was supported by a postgraduate fellowship from the Natural Sciences and

Engineering Research Council of Canada. We also thank N. Boucher for many fruitful discussions and J. Harnois for skillful professional assistance.

REFERENCES

1. Keddy C, Greene JC, Bonnell MA.1994. *A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment, and freshwater in Canada*. Scientific series no. 198. Ecosystem conservation directorate , Ottawa, ON, Canada
2. Environment Canada. 1992. Biological test method: toxicity test using luminescent bacteria (*Photobacterium phosphoreum*). Report No. EPS 1/RM/24. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa, ON, Canada
3. Bettermann AD, Lazorchak JM, Dorofi JC.1996. Profile of toxic response to sediments using whole-animal and in vitro submitochondrial particle (SMP) assays. *Environ Toxicol Chem* 15:319-324.
4. Isomaa B, Liljus H. 1995. The urgent need for *in vitro* tests in ecotoxicology. *Toxicol in Vitro* 9:821-825.
5. Wenzel A, Nendza M, Hartmann P, Kanne R. 1997. Testbattery for the assessment of aquatic toxicity. *Chemosphere* 35:307-322.
6. Kleczkowski LA. 1994. Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:339-361.
7. Mimeault M, Carpentier R. 1988. Electrochemical monitoring of electron transfer in thylakoid membranes. *Enzyme Microb Technol* 10:691-694.

8. Agostiano A, Goetze DC, Carpentier R. 1992. Cyclic voltammetry measurements of the photoelectrogenic reactions of thylakoid membranes. *Photochem Photobiol* 55:449-455.
9. Goetze DC, Carpentier R. 1990. Monitoring oxygen reduction by photosystem I in whole thylakoid membranes using a photoelectrochemical cell. *J Photochem Photobiol* 8:17-26.
10. Loranger C, Carpentier R. 1994. A fast bioassay for phytotoxicity measurements using immobilized photosynthetic membranes. *Biotechnol Bioeng* 44:178-183.
11. Cocquempot MF, Thomasset B, Barbotin JN, Gelif G, Thomas D. 1981. Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*. 11:193-198
12. Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975:384-394.
13. Thomasset B, Thomasset T, Vejux A, Jeanfils J, Barbotin JN, Thomas D. 1982. Immobilized thylakoids in a cross-linked albumin matrix. *Plant Physiol* 70:714-722.
14. Carpentier R. 1997. Immobilization of photosynthetic membranes in an albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix. In Bickerstaff GF, eds, *Methods in Biotechnology*, Vol 1-Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp 109-115.
15. Thomasset B, Barbotin JN, Thomas D. 1991. Biochemical and biophysical changes in the properties of isolated chloroplast membranes: Effects of glutaraldehyde and serum albumin. *Plant Physiol Biochem* 29:449-456.

16. Finney DJ. 1971. *Probit analysis*, Third Edition. Cambridge University Press, London, UK.
17. Carpentier R, Lemieux S, Mimeault M, Purcell M, Goetze DC. 1989. A photoelectrochemical cell using immobilized photosynthetic membranes. *Bioelectrochem Bioenerg* 22:391-401.
18. Purcell M, Carpentier R, Bélanger D, Fortier G. 1990. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnol Tech* 4:363-368.
19. Carpentier R, Loranger C, Chartrand J, Purcell M. 1991. Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements. *Anal Chim Acta* 249:55-60.
20. Environment Canada. 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Report No. EPS 1/RM/12. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa, ON, Canada.
21. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail. 1996. *Toxicité des herbicides les plus utilisés au Québec*. Service du répertoire toxicologique, Gouvernement du Québec, Québec, Canada.
22. Mc Rae B. 1989. *Caractérisation et identification des pesticides susceptibles d'être lessivés et des zones potentielles de contamination de l'eau souterraine par les pesticides au Canada*. Direction des pesticides, Agriculture Canada, Ottawa, ON, Canada.
23. Trebst A. 1980. Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods Enzymol* 69:675-715.

24. Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec. 1998. *Critères de qualité de l'eau de surface au Québec*. Direction des écosystèmes aquatiques, Ministère de l'Environnement et de la Faune, Québec, Canada.
25. Hatzios K K. 1994. Herbicides and herbicides resistance. In Arntzen CJ, Ritter EM, eds, *Encyclopedia of Agricultural Science*, Vol 2. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 501-512.
26. Renganathan M, Bose S. 1990. Inhibition of photosystem II by Cu^{++} ion. Choice of buffer and reagent is critical. *Photosynth Res* 23:95-99.
27. Environnement Canada. 1992. Biological test method. Growth inhibition test using freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Report No. EPS 1/RM/25. Conservation and Protection, Environment Canada, Ottawa, ON, Canada.
28. Thellen C, Blaise C, Roy Y, Hickey C. 1989. Round robin testing with *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. *Hydrobiologia* 188/189:259-268
29. Peterson HG, Boutin C, Martin PA, Freemark KE Ruecker NJ, Moody MJ. 1994. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquat Toxicol* 28:275-292.
30. Fairchild JF, Ruessler DS, Haverland PS, Carlson AR. 1997. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Arch Environ Contam Toxicol* 32:353-357
31. Pratt JR, Melendez AE, Barreiro R, Bowers NJ. 1997. Predicting the ecological effects of herbicides. *Ecol Appl* 7:1117-1124.

32. Caux PY, Ménard L, Kent RA. 1996. Comparative study of the effects of MCPA, butylate, atrazine, and cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. *Environ Pollut* 92:219-225.
33. St-Laurent D, Blaise C, MacQuarrie P, Scroggins R, Trottier B. 1992. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environ Toxicol Water Qual* 7:35-48.
34. Schäfer H, Hettler H, Fritsche U, Pitzen G, Röderer G, Wenzel A. 1994. Biotests using unicellular algae and ciliates for predicting long-term effects of toxicants. *Ecotoxicol Environ Saf* 27:64-81.
35. Blaise C, Harwood M. 1991. Contribution à l'évaluation écotoxicologique du tébuthiuron – un herbicide de la classe des urées substituées. *Rev Sci 'Eau* 4:121-134.
36. Maule A, Wright SJL. 1984. Herbicide effects on the population growth of some green algae and cyanobacteria. *J Appl Bacteriol* 57:369-379.

Table 1. Toxicants selected and the concentration of the stock solutions

Toxicants	Active ingredient (%) or formulation	Origin	Concentration in the stock solution (mg/L)
CuCl ₂	----	Fisher Scientific	1 000 expressed as Cu ²⁺
Pentachlorophenol	----	Sigma	1 000 with 2 % ethanol
Sodium dodecyl sulfate	99	Sigma	10 000
Atrazine	99.8	Ciba-Geigy	25
Cyanazine	95	Ultra Scientific	100
Hexazinone	99	Chem Service	100
Metribuzin	99	Chem Service	100
Diuron	80	Sigma	40
Tebuthiuron	99	Chem Service	100
Propanil	99	Chem Service	100 with 1 % ethanol
Bromoxynil	98	Chem Service	100
Bentazone	99	Chem Service	100
2,4-D	99	Ultra Scientific	1 000 with 1 % ethanol
Glyphosate	99	Chem Service	5 000
Metolachlor	DUAL 960 EC	Ciba-Geigy	1 000 with 1 % ethanol

Table 2. Comparison of the responses to different toxicants by immobilized thylakoid membranes and thylakoids in suspension.

		Immobilized thylakoids	Thylakoids in suspension ^a
Toxicants		IC50 / LOEC (mg/L)	IC50 (mg/L)
Herbicides			
Photosynthesis inhibitors			
	Atrazine ^b	0.33 / 0.01 to 0.05	0.37
	Diuron	0.15 / 0.01	0.11
	Bromoxynil	19 / 2	13
Other mode of action			
	Metolachlor	580 / 350	500 ^c
Metal ion			
	Cu ²⁺ ^d	47 / ---	3.5
Fungicide			
	Pentachlorophenol	--- / 20	28
Detergent			
	Sodium dodecyl sulfate	690 / 100	15

Results were obtained with optimal conditions in each system:

– immobilized thylakoids, 250 µg Chl/mL, exposure time to the toxicant of 20 minutes

– thylakoids in suspension, 20 µg Chl/mL, exposure time to the toxicant of 5 minutes.

^a LOECs were not determined.

^b From six complete concentration-response curves (tests 13 to 18 in Fig. 4); IC50 is from the pooled curve.

^c Barley thylakoids at 100 µg Chl/mL, exposure time to the toxicant of 5 minutes.

^d From the chloride salt.

Table 3. Responses of the photosynthetic electron transport chain to specific inhibitors (photosystem II inhibiting herbicides) and to herbicides with non-photosynthetic modes of action; comparison with a standardized algal bioassay and water quality guidelines.

		Immobilized thylakoids		Algal growth inhibition using <i>S. capricornutum</i>		Water quality guidelines for raw water ^[24]
Herbicides		IC50 (r ²) ^a	LOEC	IC50- 96 h		
Chemical class	Chemical	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)		(mg/L)
Specific inhibitors of the photosynthetic electron transport chain						
Triazines						
	Atrazine ^b	0.33 (0.986)	0.01 to 0.05	0.026 ^[32]	0.235 ^[30]	0.005
	Cyanazine	0.072 (0.999)	0.005	0.017 ^[33]	0.059 ^[32] 0.027 ^[30]	0.01
	Hexazinone	0.12 (0.986)	0.008	0.028 ^[33]		----
	Metribuzin	0.13 (0.989)	0.01	0.043 ^[30]		0.08
Substituted ureas						
	Diuron	0.15 (0.994)	0.01	0.036 ^{[34]c}		0.15
	Tebuthiuron	0.41 (0.989)	0.005	0.08 ^[35]		----
Substituted amide						
	Propanil	0.73 (0.983)	0.02	0.09 ^{[36]d}		0.02
Phenol derivative						
	Bromoxynil	19 (0.978)	2	3.4 ^[33]	7.8 ^[30]	0.005
Unclassified heterocycle						
	Bentazone	16 (0.986)	1	----		0.03

Herbicides with non-photosynthetic modes of action					
Phenoxyacid	2,4-D	>1000 ^c (---)	300	24 ^[33] 42 ^[30]	0.1
Aliphatic acid	Glyphosate	2370 (0.990)	750	7.8 ^[33]	0.28
Acetanilide	Metolachlor	580 (0.992)	350	0.051 ^[33] 0.077 ^[30]	0.05

^a r^2 : coefficient of determination

^b From six complete concentration-response curves (tests 13 to 18 in Fig. 4); IC50 is from the pooled curve.

^c IC50-72 h with *Scenedesmus subspicatus*

^d *Chlorella pyrenoidosa*

^e Concentration which produced an inhibition of 30 %.

Fig. 1. Schematic representation of the micro-electrochemical cell: (A) cell cover; (B) Plexiglas cover; (C) inlet and outlet for liquid sample; (D) plastic disc; (E) cell chamber (80 μL); (F) electrodes disc; (G) platinum working electrode; (H) platinum counter electrode; (I) stainless-steel base with inlet (J) and outlet (K) for water circulation.

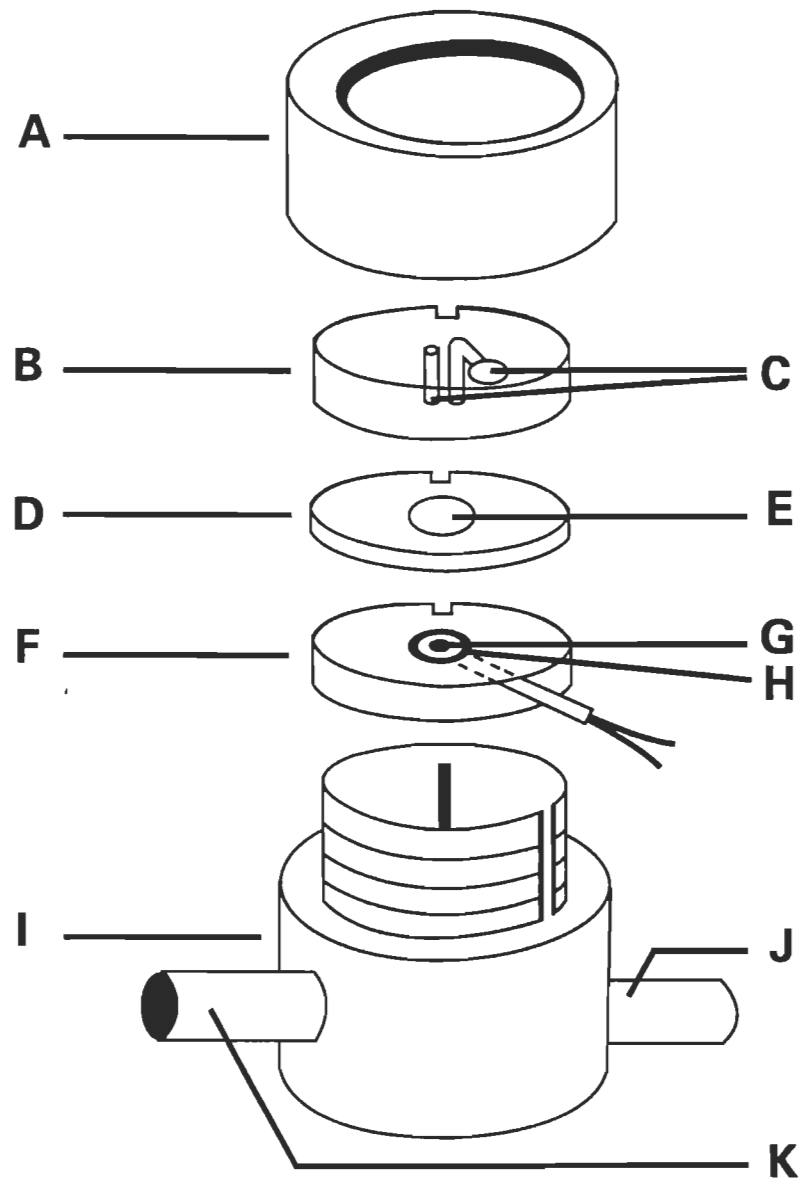


Fig. 2. Inhibition of photocurrent in the presence of 0.5 mg/L atrazine at various Chl concentrations in the immobilized matrix and various incident light intensities. Each column represents the mean of duplicate measurements (coefficient of variation $\leq 5\%$). Other details are presented in Materials and Methods.

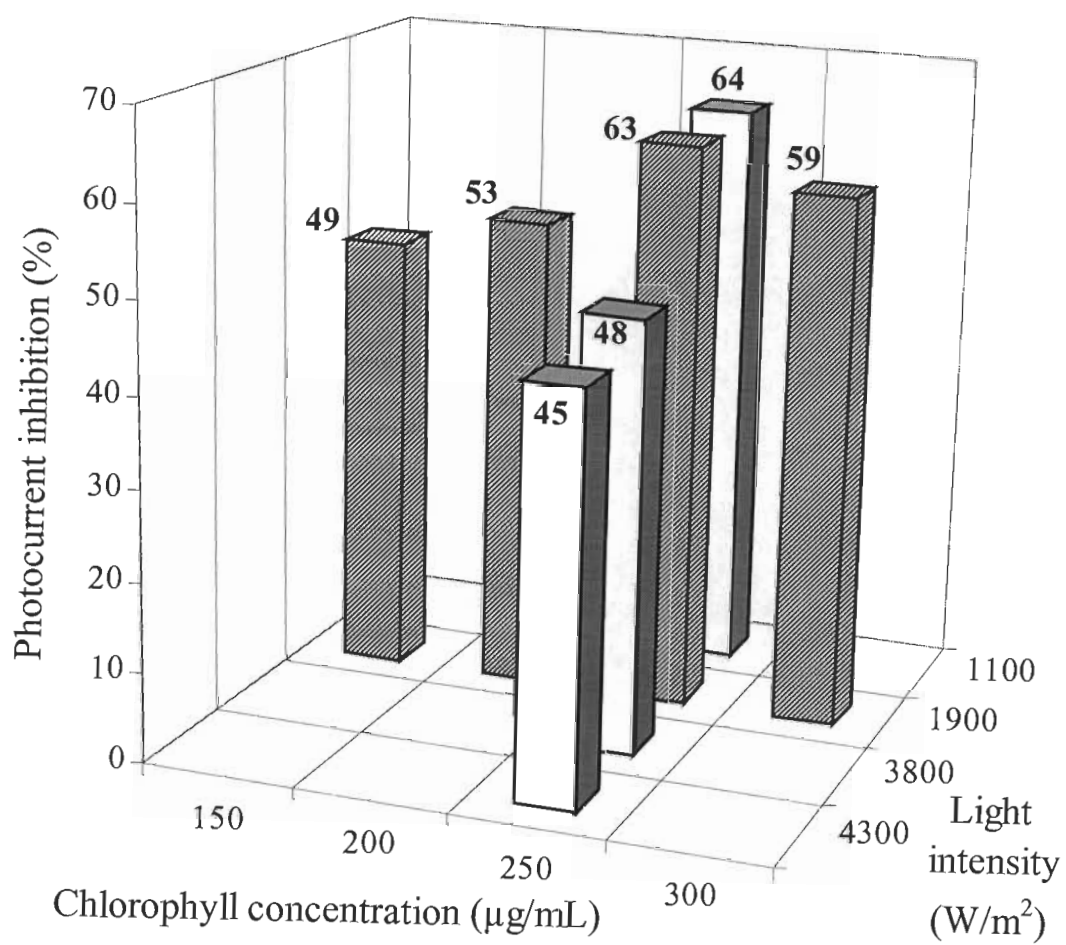


Fig. 3. Stability of the immobilized samples stored in the dark at 4° C. For each storage time (except 12 days), two independant atrazine concentration-response curves were obtained with two different immobilized preparations (□, curve 1; ◆, curve 2). All the samples were obtained from the same thylakoid preparation. (A) Data points represent IC50s and error bars are 95 % confidence intervals obtained from probit analysis. (B) Data points represent the means and error bars are standard deviations of the controls photocurrent (n = 3-4).

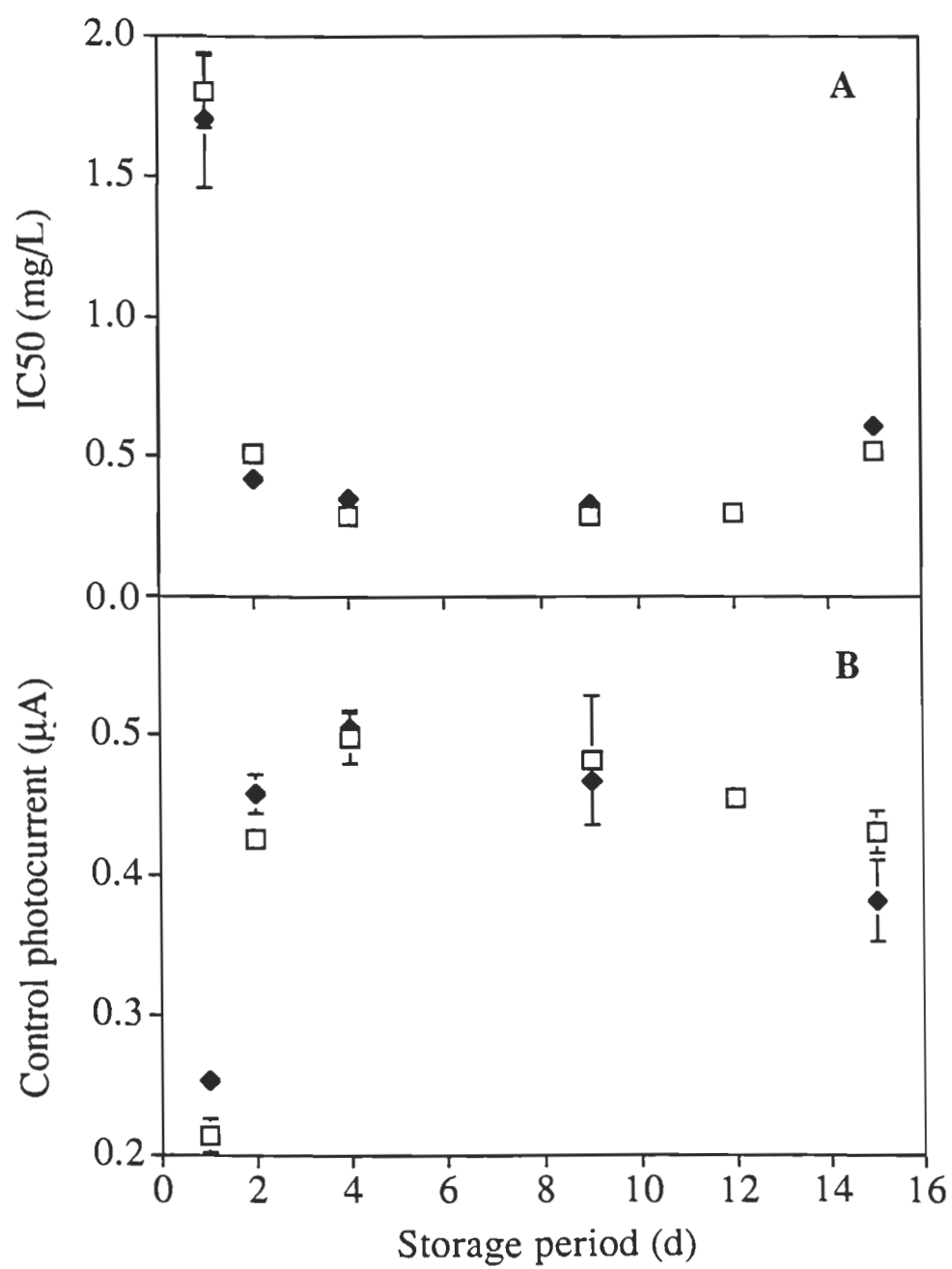


Fig. 4. (A) Control chart of atrazine 20 min-IC₅₀s. Each IC₅₀ and its 95 % confidence interval were obtained from probit analysis. (B) Control photocurrent associated with each test; the error bars are standard deviation of the mean ($n = 3-4$ except tests 13 to 18 where $n = 5-6$).

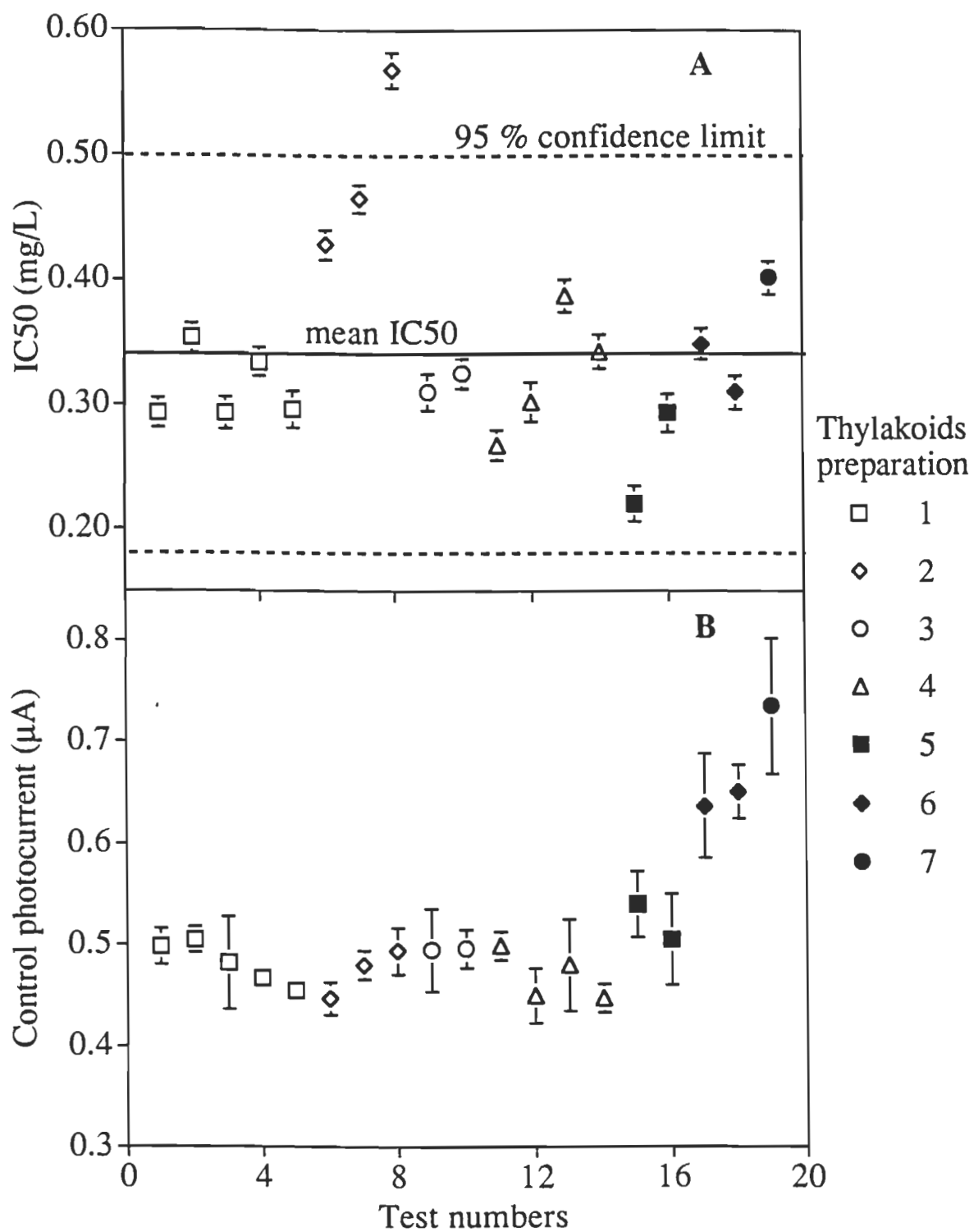
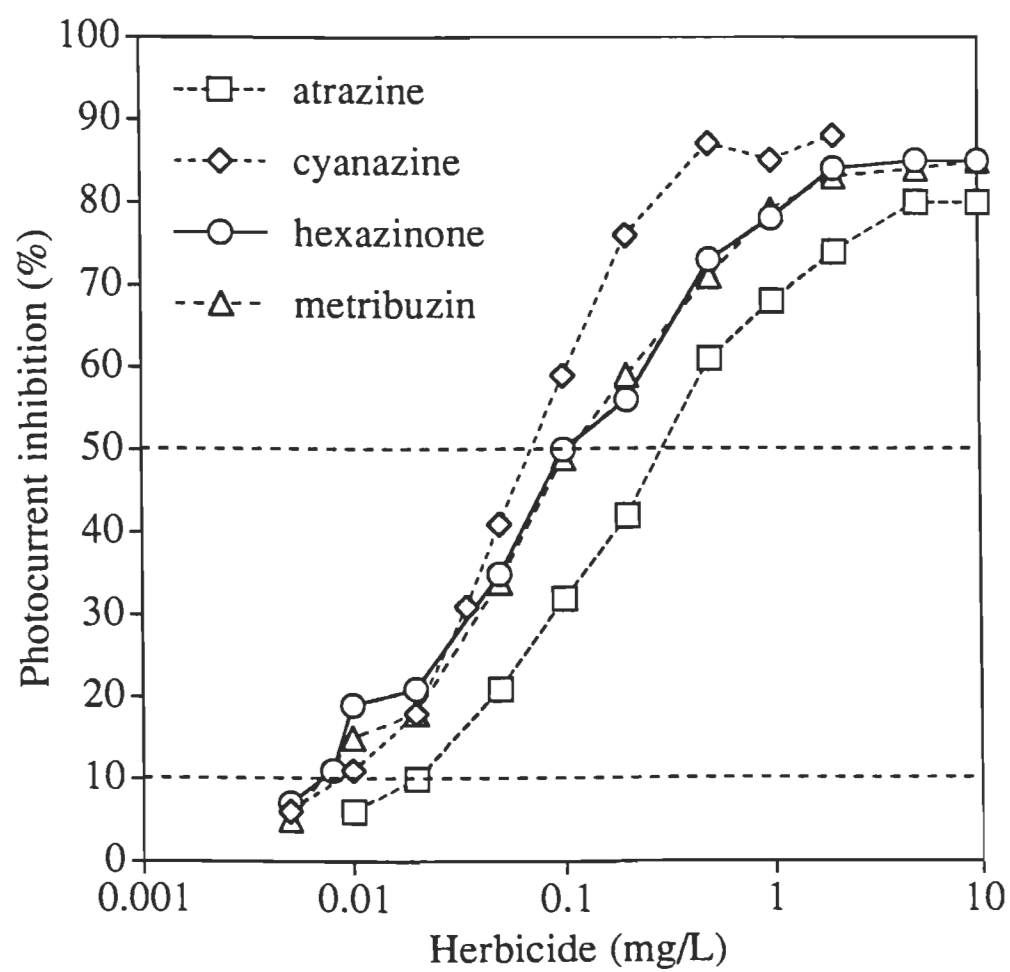


Fig. 5. Concentration-response curves from herbicides triazines (atrazine, cyanazine) and triazinones (hexazinone, metribuzin); the atrazine concentration-response curve is from pooled data of tests 13 to 18 in the control chart.



CHAPITRE 3

COMPARATIVE STUDY OF THYLAKOID MEMBRANES SENSITIVITY FOR HERBICIDE DETECTION AFTER PHYSICAL OR CHEMICAL IMMOBILIZATION.

DENISE LABERGE¹, RÉGIS ROUILLON² AND ROBERT CARPENTIER¹ *

¹Groupe de Recherche en Énergie et Information Biomoléculaires,
Université du Québec à Trois-Rivières,
C.P. 500, Trois-Rivières (Québec), Canada, G9A 5H7.

²Groupe d'Etudes et de Recherches Appliquées Pluridisciplinaires, URA CNRS 461,
Université de Perpignan, Centre de Phytopharmacie,
52 ave de Villeneuve, 66860 Perpignan, France.

* To whom correspondence may be addressed.

A micro-test using immobilized thylakoid membranes as sensing element in a micro-electrochemical cell has been developed to assess impairment at the level of the light-driven transport of electrons. In this study, thylakoids isolated from spinach leaves were either immobilized by entrapment in poly(vinylalcohol) bearing styrylpyridinium groups or by chemical immobilization in an albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix. The two immobilization procedures were compared upon the sensitivity of the immobilized materials to detect nine herbicides targetting photosystem II. In spite of the largely differing mode of immobilization, the procedures led to strikingly similar detection capabilities for herbicides. Inherent characteristics of both immobilization procedures are also discussed.

Keywords: Thylakoids; Photosynthetic membranes; Herbicides; Immobilization

Introduction

In the field of aquatic toxicology, there is a growing interest for bioassays which evaluate sublethal toxicity by the mean of microscale testing.¹ Some microscale tests use cellular or subcellular materials (e. g. tissue cultures, enzyme systems) in a mode of action related approach. This relates to the level of biological organization where pollutants may interact with a target site provoquing the first toxic responses. Such responses are at the basis of repercussions observed at the organism level. Moreover, at this biochemical level, the toxic mechanisms are common among many species.^{2, 3}

Detection of chemicals interfering with photosynthesis is primordial because it constitutes a vital process for plant species. To assess impairment of the light-driven electron transport, a test using isolated thylakoid membranes as the sensing element in a micro-electrochemical cell has been developed.⁴⁻⁶ In this cell, absorbed light energy is converted by thylakoid membranes into hydrogen peroxide. This latter species is oxidised at a platinum electrode generating a photocurrent which is decreased by photosynthetic inhibitors.^{7, 8}

The short lifetime of the isolated thylakoid membranes constitutes a limiting factor for biotechnological applications. Therefore, various immobilization techniques have been designed and investigated for their capability of improving the stability of biological functions.^{9,10} Techniques such as fluorescence and photoacoustic spectroscopy contributed in understanding biochemical and biophysical changes induced by immobilization processes.¹⁰

In this study, two immobilization procedures were compared upon the sensitivity of the immobilized thylakoids to detect nine photosystem II inhibiting herbicides using the electrochemical approach described above. Entrapment of thylakoids in poly(vinylalcohol) bearing styrylpyridinium groups (PVA-SbQ)¹¹ and their immobilization in a bovine serum albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix (BSA-Glu)¹² were compared. In the PVA-SbQ procedure, the biological material is stabilized without chemical bondings. The thylakoids are confined into a network established by the polymerized PVA-SbQ. The physical nature of PVA-SbQ immobilization was opposed to the chemical nature of BSA-Glu immobilization in this comparison of the availability of binding sites for inhibitors. Effectively, in the BSA-Glu immobilization, the glutaraldehyde builds a network of covalent bondings mainly with the free NH₂ of both thylakoid proteins and albumin. The albumin's role is mainly to protect thylakoids against too many bondings so that an adequate biological functioning is retained. In spite of the largely differing mode of immobilization, the procedures led to strikingly similar detection capabilities for herbicides.

Materials and methods

Preparation of thylakoid membranes

Thylakoid membranes were isolated from 100 g deveined spinach leaves. All steps were performed at 4° C under green light. Spinach leaves were homogenized in 20 mM Tes-NaOH (pH 7.5), 330 mM sorbitol, and 5 mM MgCl₂ at 0° C. The homogenate was filtered

through several layers of cheesecloth, and the filtrate was centrifuged at 2500 *g* for 1 minute. The pellet was suspended in a hypotonic solution (1:20 of the above Tes buffer) freeing thylakoid fragments from broken chloroplasts. The thylakoid membranes were collected as a pellet at 4000 *g* for 1 minute, and they were resuspended in 25 mM MOPS-NaOH pH 7.9, 300 mM mannitol, and 2 mM EDTA. The amount of thylakoid membranes was quantified by measuring chlorophyll (Chl) concentration according to the spectrophotometric procedure of Porra et al.¹³ The thylakoid membranes were diluted with the resuspension buffer at a Chl concentration of 2 mg/mL. Aliquots were immediately stored in liquid nitrogen until use.

Immobilization of thylakoid membranes

In this study, all the immobilized samples were obtained from the same thylakoid preparation.

PVA-SbQ immobilization. The thylakoid preparation (175 μ L) was pre-diluted with the resuspension MOPS buffer (325 μ L) and mixed with 3 g of a solution of PVA-SbQ (degree of polymerization 3500, degree of saponification 88, SbQ content 0.83 mol%, solid content 11 %, pH 6.0; the PVA-SbQ was a gift from Toyo Gosei Kogyo Co, Ltd., Japan). The immobilization mixture was deposited (60 mg samples) in Petri dishes. For polymerization, the samples were exposed to UV (235 and 365 nm) for 2 min and stored in a dry state at 4° C in the dark. The immobilized samples used for testing contained 6 μ g Chl.

BSA-Glu immobilization. The immobilization procedure used was similar to that described

previously.^{12, 14} The procedure consisted of mixing 1.65 mL of 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.1, 1.25 mL of 20 % w/v bovine serum albumin (BSA) solution, and 1 mL of 1.5 % glutaraldehyde solution. The mixture was incubated for 2 minutes and then 0.6 mL of thylakoid suspension (560 μ L thylakoid preparation and 40 μ L MOPS buffer) was added. The immobilization mixture was divided into 80 μ L aliquots in Petri dishes. The samples were frozen at -20° C for 2 hours and then thawed and kept in the dark at 4° C until use. The samples which are insoluble sponge-like discs were covered with the test buffer (see below), preventing them to dry. The immobilized samples used for testing contained 20 μ g Chl.

In both immobilization approaches, the samples were distributed to correspond to the surface of the measuring-chamber (circle of ~1 cm in diameter) in the micro-electrochemical cell. This enables the sample to stick perfectly on the electrodes surface.

Experimental set-up

The electrochemical cell (see Laberge et al.¹⁵) was composed of two concentric platinum electrodes built in the bottom plate of the measuring-chamber (80 μ L). The cell was kept at 22° C by a water circulation. The electrodes were connected to a polarograph (type PRGE) Solea-Tacussel, and electrochemical measurements were performed at 550 mV. For photocurrent generation, the white light beam was directed on top of the cell via a fiber-optic guide. The current produced was monitored on a chart recorder.

Experimentation and data treatment

To ensure the best samples conditions, experimentation was done under green light, and samples were kept at 4° C prior to measurements. A sample of immobilized thylakoids was introduced in the measuring-chamber which was then filled with the test solution. The test solution was either an electrolytic medium containing 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 0.15 mM NaCl, and 1 mM MgCl₂ (controls) or a dilution of herbicide in that test buffer. The potential was applied and after 5 minutes of equilibration, the light was turned on to record the photocurrent. The activities of various test concentrations were expressed as percent inhibition relative to the controls. The herbicide concentration that inhibited 50 % of the control photocurrent (IC₅₀) were determined from a concentration-response curve using probit analysis.¹⁶ According to herbicides, the probit regression analysis was generally performed on five or six data points in the linear portion of the curves (exceptionally four or seven data points). Highest test concentrations were not used because they were pulling away the IC₅₀ values from the graphical estimation. Moreover, data points below 10 % inhibition were not included in the IC₅₀ estimations in accordance with the limits of detection previously set with both immobilization techniques.^{5, 15}

Results and discussion

In this study, gel entrapment (PVA-SbQ) and chemical immobilization (BSA-Glu) of thylakoid membranes are compared in the application of herbicide biodetection. Both

immobilization approaches were elaborated separately and their characteristics such as activity yield, stability of biological functions after immobilization, and the retained ability of the immobilized thylakoids to detect phytotoxic chemicals were known from previous investigations.^{5, 11, 17}

Photocurrent measurements obtained with both immobilization techniques are shown in *Figure 1*. Traces were similar in regard of shape but the PVA-SbQ samples generated twice the photocurrent of the BSA-Glu samples. Nevertheless, the magnitude of control photocurrents produced by the BSA-Glu samples was largely sufficient to ensure an adequate spread of photocurrents with a concentration series of an inhibitor.

The typical sigmoidal response encountered in toxicity testing is illustrated by examples of concentration-response curves generated by three herbicides (*Figure 2A, B, and C*). These three herbicides were also chosen to depict all the cases observed. The herbicide cyanazine illustrated the case where the BSA-Glu samples were more sensitive (*Figure 2A*), similar sensitivity in both types of immobilized samples was observed towards diuron (*Figure 2B*), and the PVA-SbQ samples were more sensitive to bromoxynil (*Figure 2C*). As also observed in *Figure 2A, B, and C*, at high concentration of herbicides, the percentage of photocurrent inhibition was lower in BSA-Glu samples than in PVA-SbQ samples. This phenomenon was observed with all the nine herbicides tested. Further investigations should attempt to understand this observation as it could possibly reveal a way to improve the sensitivity of detection of the BSA-Glu samples.

The IC50s were estimated using probit regression lines of which examples are shown on *Figure 2D, E, and F*. Comparing the two different immobilization approaches, seven on nine herbicides showed similar regression-line slopes, i. e. superimposed or

parallel lines (*Table 1*). With cyanazine and hexazinone, the PVA-SbQ immobilized samples produced regression-line slopes around twice the values obtained with the BSA-Glu immobilized samples. This was reflected by a more abrupt decrease of inhibition as the herbicide concentration was decreasing (*Figure 2A*, PVA-SbQ immobilization). These two higher slope values indicated a narrower range of detectable concentrations of herbicides than generally observed (*Table 1*). Cyanazine and hexazinone were also the only two herbicides which presented higher IC₅₀ values, i. e. less sensitivity, with PVA-SbQ samples (*Table 2* and *Figure 3*).

For all the herbicides tested, the toxicity responses obtained with the PVA-SbQ and the BSA-Glu immobilized samples were close, all within less than one order of magnitude (*Table 2*). The most different results came from cyanazine and metribuzin. The BSA-Glu samples were more sensitive to cyanazine whereas the PVA-SbQ samples were more sensitive to metribuzin. The chlorophyll concentrations used in the samples were the concentrations already determined as optimal for herbicide detection in each system: PVA-SbQ immobilized samples contained 6 µg Chl and BSA-Glu immobilized samples contained 20 µg Chl.^{5, 15} This difference in optimal sample concentrations is probably reflecting the different micro-environments provided to thylakoids by the two methods.

In *Table 2*, a comparison with native thylakoids is also added for three herbicides representing important chemical classes of photosystem II inhibiting herbicides. From these results, it appeared that with optimized testing concentrations, both immobilization methods can demonstrate a sensitivity of detection comparable to native thylakoids. Immobilization matrices provided a barrier between the thylakoids, which are the sensing elements, and the toxicants to detect. Hence, phenomena such as a reduction in molecular diffusion

(electroactive species or inhibitors) or adsorption of inhibitors on the matrices probably occur to some unknown extent. Most photosynthetic electron transport intermediates are bound to specific apoproteins. It was reported that reactions between glutaraldehyde and thylakoid proteins provoked rotational and intramolecular rearrangements, although adding BSA is known to attenuate the deleterious effect of glutaraldehyde.^{14, 18} Our results pointed out that both immobilization matrices and the detection environments they created offered comparable diffusion to added chemicals and similar accessibility for inhibitors to their thylakoid binding sites.

A graphical comparison of the relative sensitivity of PVA-SbQ and BSA-Glu immobilized samples to the nine herbicides tested is presented in *Figure 3*. Four herbicides were slightly apart from the line of equivalent sensitivity to a given herbicide. Cyanazine and hexazinone were more easily detected by the BSA-Glu immobilized samples (right side of the line) whereas the PVA-SbQ immobilized samples were more sensitive to metribuzin and bromoxynil (left side of the line). These four herbicides were all triazines except bromoxynil, a phenol derivative. Only the poorer sensitivity of the BSA-Glu immobilized samples observed with bromoxynil may find an explanation. Effectively, it has been demonstrated that albumin could partly prevent inhibition by phenol derivatives.¹⁹ However, in *Table 2*, the similarity between the bromoxynil IC₅₀ reported for native thylakoids where BSA molecules were not present and the bromoxynil IC₅₀ observed in this study for BSA-Glu immobilized samples is in contradiction with this interpretation.

On a practical point of view, samples from both immobilization methods presented equivalent ease of handling for electrochemical measurements. However, the physicochemical properties of the materials are different. The PVA-SbQ immobilized

samples are hydrophilic and they dislocate during prolonged exposure to aqueous solutions. In contrast, the BSA-Glu immobilization procedure produces an insoluble matrix which is well suited for longer incubation periods in aqueous solution potentially improving the detection of chemicals with a slower rate of inhibition.

On the other hand, the dry state preservation of the PVA-SbQ immobilized material is advantageous because it prevents microbial contamination of the samples. Such contamination could be observed with the wet BSA-Glu immobilized samples if they were kept more than two weeks even at 4° C. The use of antimicrobial agents should be avoided as they can possibly interfere with the herbicide detection.

In conclusion, this comparative study showed that both immobilization approaches were equivalent in their performance of detection towards the herbicides tested. Further investigations should now include environmental samples.

Acknowledgments

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). D. L. was supported by a graduate student fellowship from NSERC and an international travel award from Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche of Québec.

References

1. Blaise, C., Wells, P. G. and Lee, K. Microscale testing in aquatic toxicology: introduction, historical perspective, and context. In: *Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques, and practice* Wells, P. G., Lee, K., Blaise, C., eds, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1997, 1-9
2. Isomaa, B. and Lilius, H. The urgent need for *in vitro* tests in ecotoxicology. *Toxicol. in Vitro*. 1995, **9**, 821-825
3. Wenzel, A., Nendza, M., Hartmann, P. and Kanne, R. Testbattery for the assessment of aquatic toxicity. *Chemosphere*. 1997, **35**, 307-322
4. Carpentier, R., Loranger, C., Chartrand, J. and Purcell, M. Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements. *Anal. Chim. Acta*. 1991, **249**, 55-60
5. Rouillon, R., Sole, M., Carpentier, R. and Marty, J. L. Immobilization of thylakoids in polyvinylalcohol for the detection of herbicides. *Sensors and Actuators B*. 1995, **26-27**, 477-479
6. Purcell, M., Carpentier, R., Bélanger, D. and Fortier, G. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnol. Techn.* 1990, **4**, 363-368
7. Agostiano, A., Goetze, D. C. and Carpentier, R. Cyclic voltammetry measurements of the photoelectrogenic reactions of thylakoid membranes. *Photochem. Photobiol.* 1992, **55**, 449-455
8. Goetze, D. C. and Carpentier, R. Monitoring oxygen reduction by photosystem I in whole thylakoid membranes using a photoelectrochemical cell. *J. Photochem.*

Photobiol. 1990, **8**, 17-26

9. Cocquempot, M. F., Thomasset, B., Barbotin, J. N., Gelif, G. and Thomas, D.
Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1981, **11**, 193-198
10. Thomasset, B., Barbotin, J. N., Thomas, D., Thomasset, T., Vejux, A. and Jeanfils, J.
Fluorescence and photoacoustic spectroscopy of immobilized thylakoids. *Biotechnol. Bioeng.* 1983, **25**, 2453-2468
11. Rouillon, R., Mestres, J. J. and Marty, J. L. Entrapment of chloroplasts and thylakoids in polyvinylalcohol-SbQ. Optimization of membrane preparation and storage conditions. *Anal. Chim. Acta.* 1995, **311**, 437-442
12. Carpentier, R. Immobilization of photosynthetic membranes in an albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix. In: *Methods in Biotechnology* Bickerstaff, G. F., eds, Vol 1 Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 1997, 109-115
13. Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989, **975**, 384-394
14. Thomasset, B., Thomasset, T., Vejux, A., Jeanfils, J., Barbotin, J. N. and Thomas, D.
Immobilized thylakoids in a cross-linked albumin matrix. *Plant Physiol.* 1982, **70**, 714-722

15. Laberge, D., Chartrand, J., Rouillon, R. and Carpentier, C. In vitro phytotoxicity screening test using immobilized spinach thylakoids. Submitted.
16. Finney, D. J. *Probit analysis*, Third Edition. Cambridge University Press, London, UK, 1971
17. Loranger, C. and Carpentier, R. A fast bioassay for phytotoxicity measurements using immobilized photosynthetic membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 1994, **44**, 178-183
18. Papageorgiou, G. C. Molecular and functional aspects of immobilized chloroplast membranes. In: *Topics in photosynthesis* Barber, J., eds, Vol 3, Elsevier, Amsterdam, 1979, 211-241
19. Trebst, A. Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods Enzymol.* 1980, **69**, 675-715

Table 1. Slopes of the regression-lines obtained from the concentration-response curves.

Herbicides	PVA-SbQ immobilization	BSA-Glu immobilization
Triazines		
Atrazine	1.3	1.3
Cyanazine	2.3	1.3
Hexazinone	2.4	1.3
Metribuzin	1.6	1.7
Substituted ureas		
Diuron	1.8	1.6
Tebuthiuron	1.4	1.2
Substituted amide		
Propanil	1.2	1.1
Phenol derivative		
Bromoxynil	1.0	1.1
Unclassified heterocycle		
Bentazone	1.2	1.0

Table 2. Comparison of herbicide 5 min-IC₅₀s generated by PVA-SbQ and BSA-Glu immobilized samples.

Herbicides	IC ₅₀ (mg/L)		
	PVA-SbQ immobilization	BSA-Glu immobilization	Reported value for native thylakoids ¹⁵
Triazines			
Atrazine	0.28	0.33	0.37
Cyanazine	0.31	0.079	----
Hexazinone	0.60	0.21	----
Metribuzin	0.099	0.44	----
Substituted ureas			----
Diuron	0.13	0.12	0.11
Tebuthiuron	0.47	0.79	----
Substituted amide			----
Propanil	0.43	0.60	----
Phenol derivative			----
Bromoxynil	5.6	16	13
Unclassified heterocycle			----
Bentazone	24	23	----

Figure 1 Photocurrent generation by immobilized thylakoid samples: A, control with PVA-SbQ immobilization; B, inhibition in the presence of 0.12 mg/L diuron with PVA-SbQ immobilization; C, control with BSA-Glu immobilization; D, inhibition in the presence of 0.12 mg/L diuron with BSA-Glu immobilization. Upward arrow indicate lighth on and I is the photocurrent recorded.

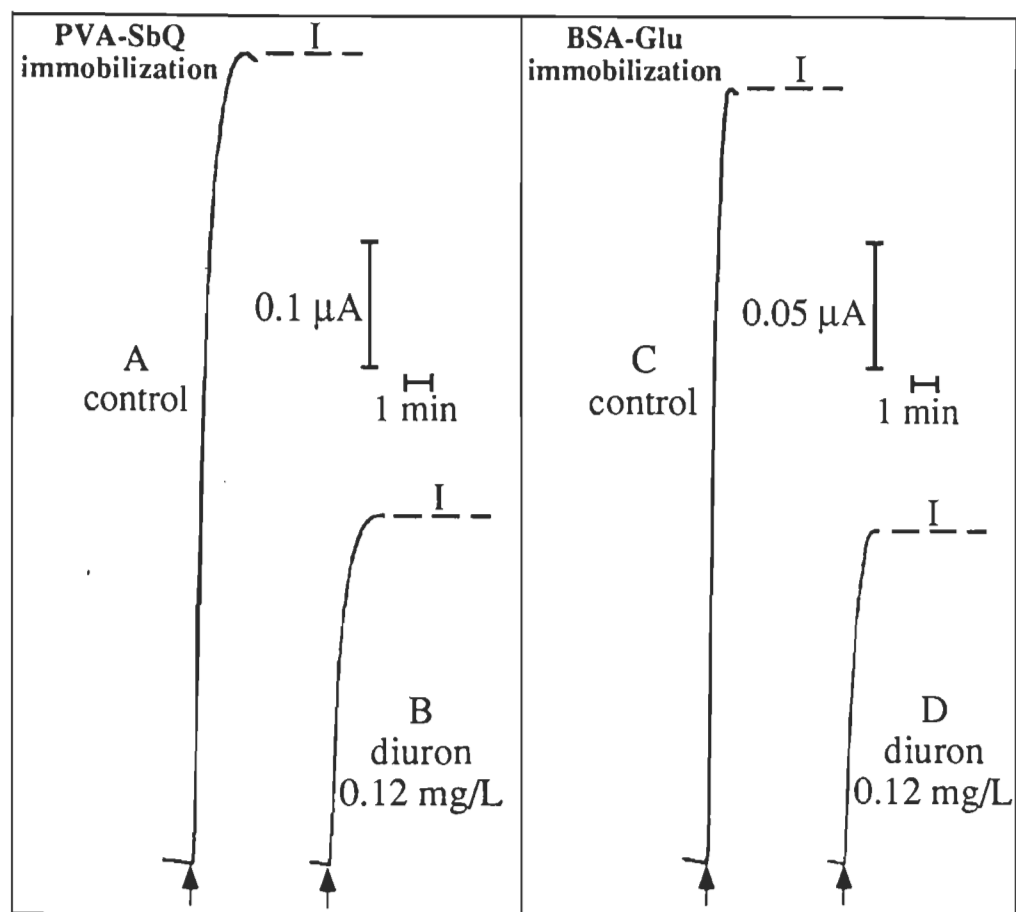


Figure 2 Concentration-response curves obtained using PVA-SbQ immobilization (□) or BSA-Glu immobilization (◆) in the presence of cyanazine (A), diuron (B), and bromoxynil (C). Corresponding probit regression lines for cyanazine (D), diuron (E), and bromoxynil (F).

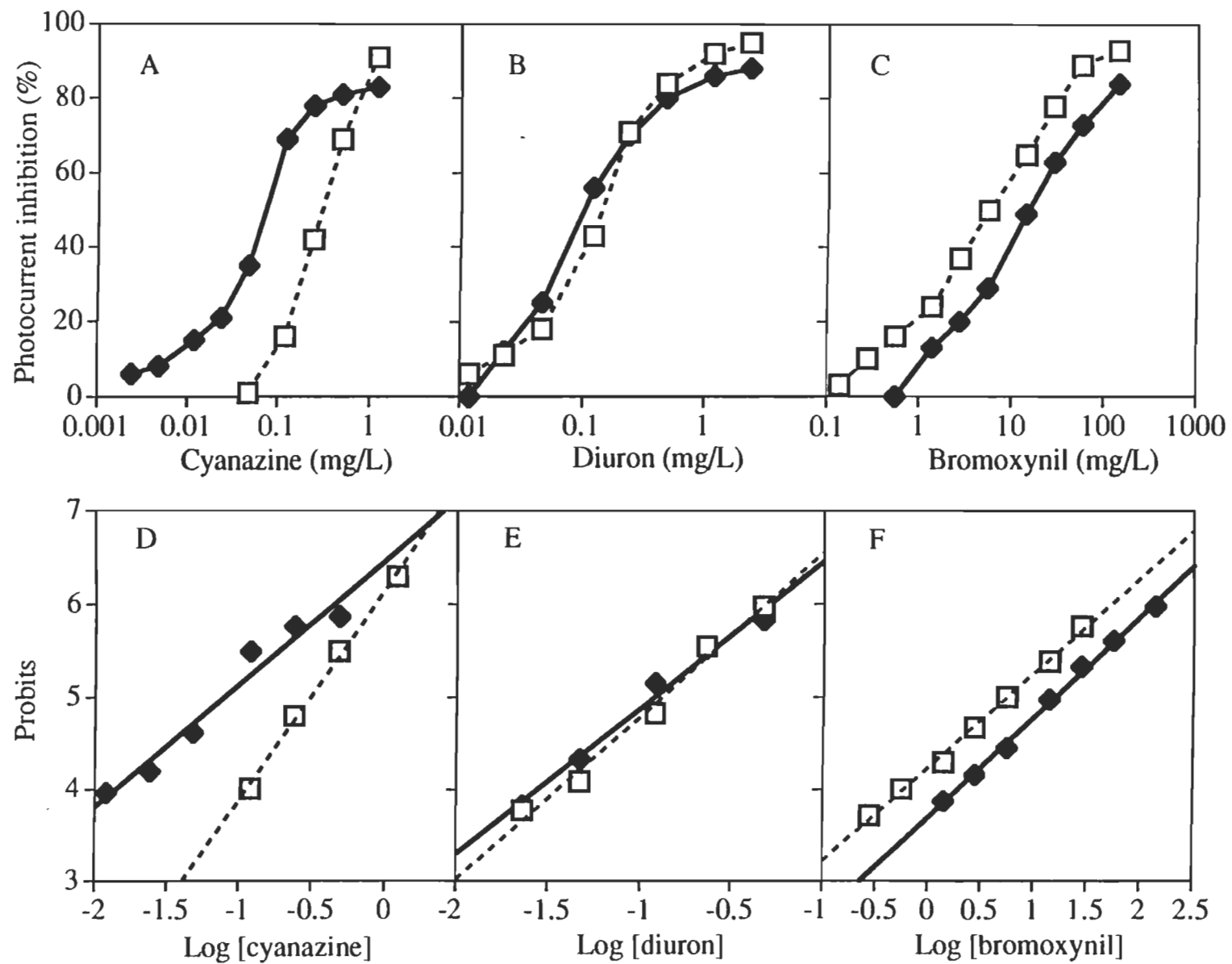
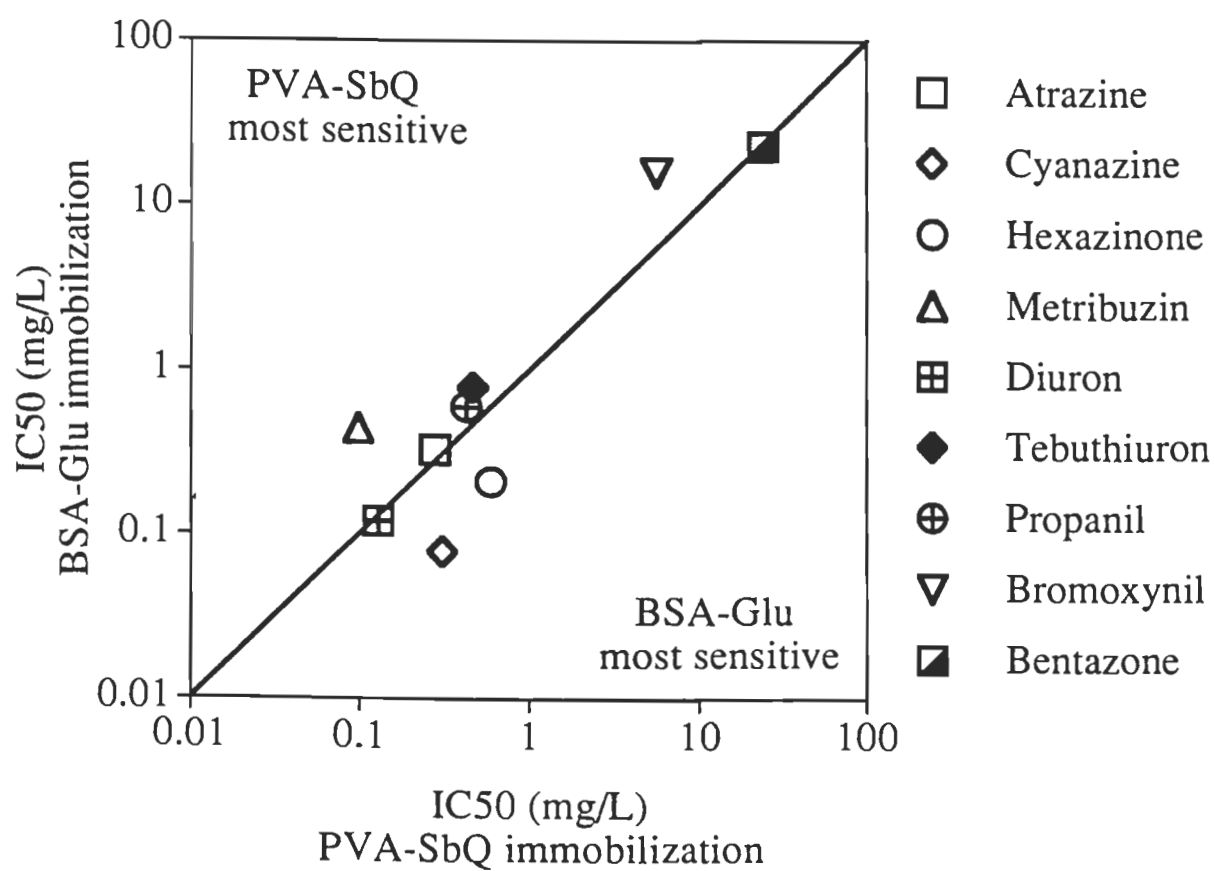


Figure 3 Comparison of the relative sensitivity of PVA-SbQ and BSA-Glu immobilized samples used in the electrochemical detection of nine herbicides.



CHAPITRE 4

COMPARAISON INTER-LABORATOIRE DES RÉPONSES AUX HERBICIDES

INHIBANT LE TRANSPORT PHOTOSYNTHÉTIQUE D'ÉLECTRONS

Dans le cadre de ce travail, il s'avérait incontournable de confronter les résultats obtenus aux Chapitres 2 et 3. De plus, les travaux portant sur la mise au point du microtest de phytotoxicité (Chapitre 2) et ceux portant sur la comparaison de l'immobilisation PVA-SbQ et BSA-Glu (Chapitre 3) ont été effectués dans deux laboratoires différents. Cet aspect est particulièrement intéressant pour juger de la fiabilité de la microcellule électrochimique et des performances globales de l'approche.

Les travaux ont été réalisés avec la même microcellule électrochimique mais les autres appareils du montage expérimental étaient différents (pour plus de détails, voir les sections «Materials and Methods» des Chapitres 2 et 3). Les mêmes conditions expérimentales de potentiel, d'intensité lumineuse et de température ont été utilisées. Par contre, les tampons de resuspension des thylacoïdes et les tampons de lecture à la microcellule électrochimique ont été différents. Dans les travaux de mise au point du microtest de phytotoxicité, un tampon Tes a été utilisé pour la resuspension des thylacoïdes ainsi que pour les lectures à la microcellule. Dans les travaux de comparaison des deux méthodes d'immobilisation, un tampon MOPS a été utilisé pour la resuspension des thylacoïdes et un tampon phosphate a servi de tampon de lecture.

Le tampon Tes interférant avec la polymérisation de PVA-SbQ, ces modifications se sont donc avérées nécessaires. D'ailleurs, il a été préalablement vérifié que ce changement de tampons n'affectait pas les réponses des thylacoïdes immobilisés selon la méthode BSA-Glu.

Concernant l'immobilisation BSA-Glu, la comparaison inter-laboratoire des réponses à différents herbicides nous a permis de constater une forte similitude des CI50s-5 min et des CI50s-20 min (Tableau 1). Pour les herbicides métribuzin et tébuthiuron, la sensibilité de détection de l'immobilisation BSA-Glu a été améliorée par un temps de contact herbicide-thylacoïdes plus long. Pour ces deux herbicides, les CI50s-20 min rejoignaient les CI50s-5 min obtenues avec l'immobilisation PVA-SbQ.

Les courbes d'inhibition obtenues selon les deux approches d'immobilisation ont été superposées aux Figures 1, 2 et 3. Ces courbes concentration-réponse ont mis en évidence qu'un contact herbicide-thylacoïdes de 20 min favorisait dans plusieurs cas une meilleure sensibilité au niveau du seuil de détection. En effet, pour l'atrazine, l'hexazinone, le métribuzin, le diuron, le tébuthiuron et le bentazone, les courbes BSA-Glu 20 min coupaient soit la courbe BSA-Glu 5 min, soit la courbe PVA-SbQ ou soit les deux autour du 50 % d'inhibition (i.e CI50s identiques) mais affichaient une sensibilité accrue au seuil de détection.

Comme mentionné précédemment (Chapitre 2), les courbes d'inhibition de l'immobilisation BSA-Glu n'atteignaient pas une valeur proche du 100 % d'inhibition à fortes concentrations. Il est étonnant de constater qu'avec l'atrazine (Fig. 1) et le diuron (Fig. 2), ce phénomène est accentué avec l'incubation de 20 min, quand par ailleurs la

détection aux faibles concentrations est améliorée. Les raisons de cette observation restent à être élucidées.

Tableau 1. Comparaison de l'immobilisation PVA-SbQ et de l'immobilisation BSA-Glu (incubations 5 min et 20 min); réponses à des inhibiteurs du transport photosynthétique d'électrons.

		Immobilisation PVA-SbQ	Immobilisation BSA-Glu	
Herbicides Familles	Produits	CI ₅₀ – 5 min ¹ (mg/L)	CI ₅₀ – 5 min ¹ (mg/L)	CI ₅₀ – 20 min ² (mg/L)
Triazines				
	Atrazine	0.28	0.33	0.33
	Cyanazine	0.31	0.079	0.072
	Hexazinone	0.60	0.21	0.12
	Métribuzin	0.099	0.44	0.13
Urées substituées				
	Diuron	0.13	0.12	0.15
	Tébutiuron	0.47	0.79	0.41
Amide substitué				
	Propanil	0.43	0.60	0.73
Dérivé phénolique				
	Bromoxynil	5.6	16	19
Hétérocycle non-classé				
	Bentazone	24	23	16

¹ Conditions expérimentales au Chapitre 3

² Conditions expérimentales au Chapitre 2

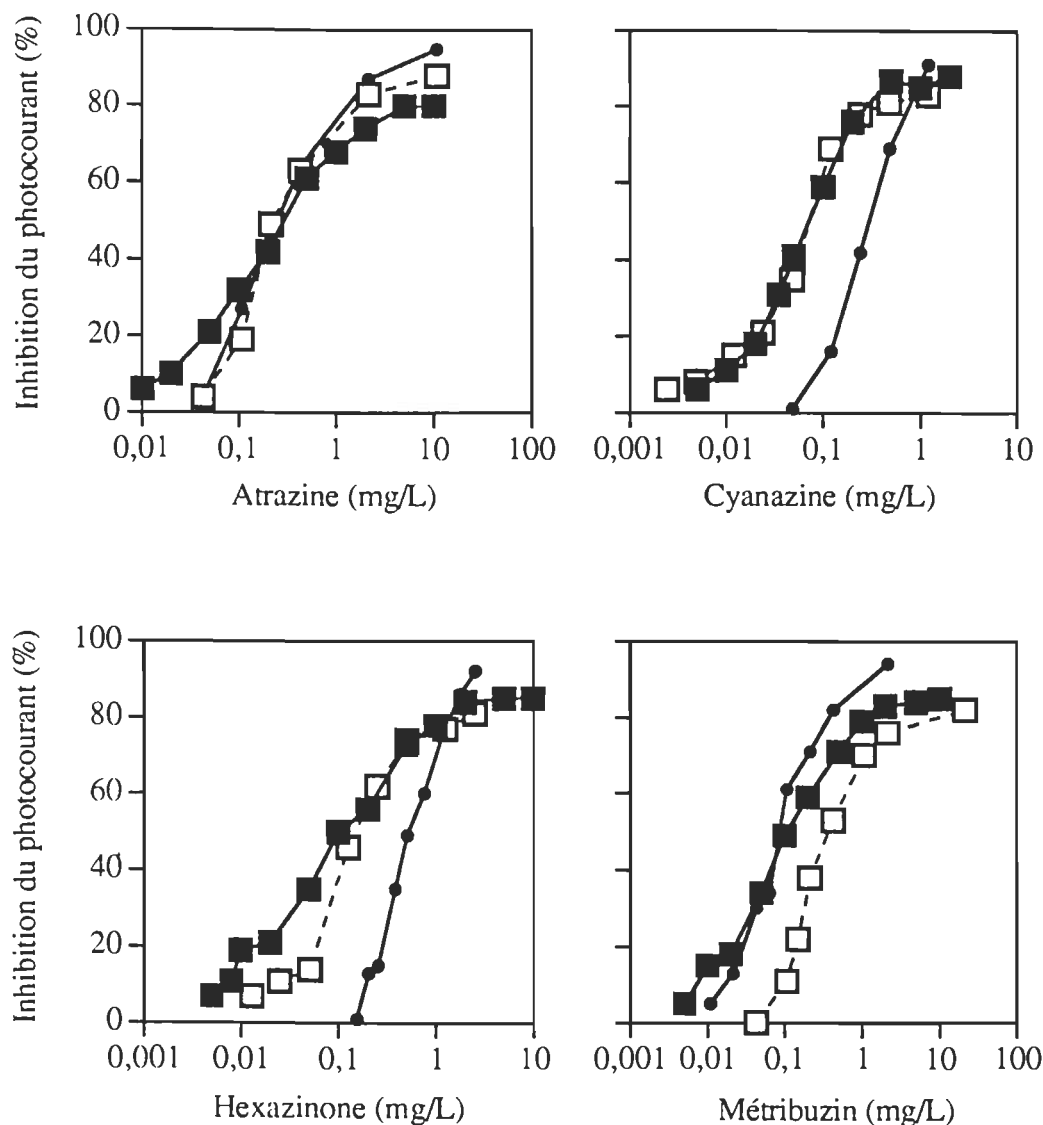


Figure 1. Inhibition du photocouleur par des herbicides de la famille des triazines. Les expériences ont été conduites avec des thylacoïdes immobilisés dans le PVA-SbQ et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (●) et avec des thylacoïdes immobilisés dans le BSA-Glu et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (□) et de 20 min (■).

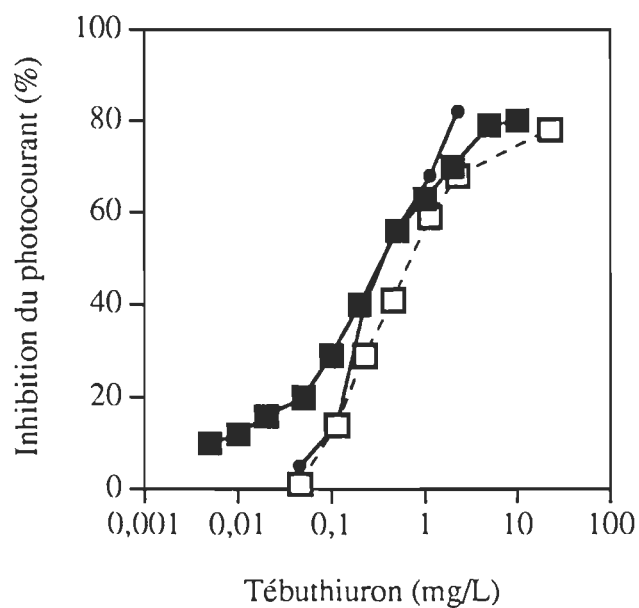
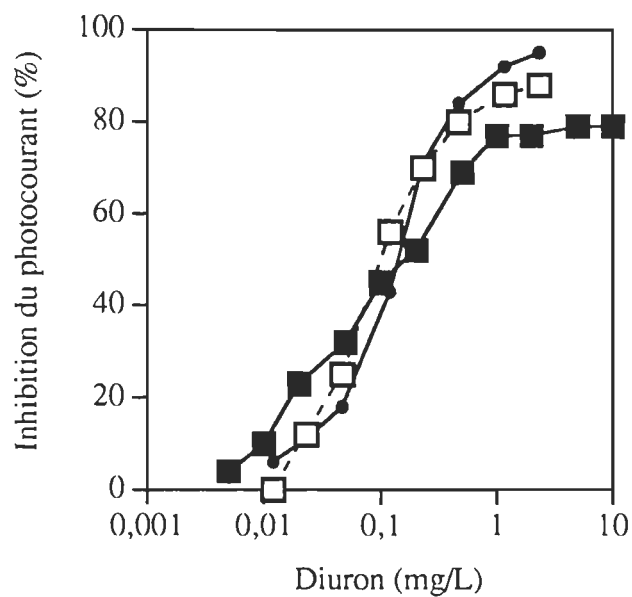


Figure 2. Inhibition du photocourant par des herbicides de la famille des urées substituées. Les expériences ont été conduites avec des thylacoïdes immobilisés dans le PVA-SbQ et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (●) et avec des thylacoïdes immobilisés dans le BSA-Glu et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (□) et de 20 min (■).

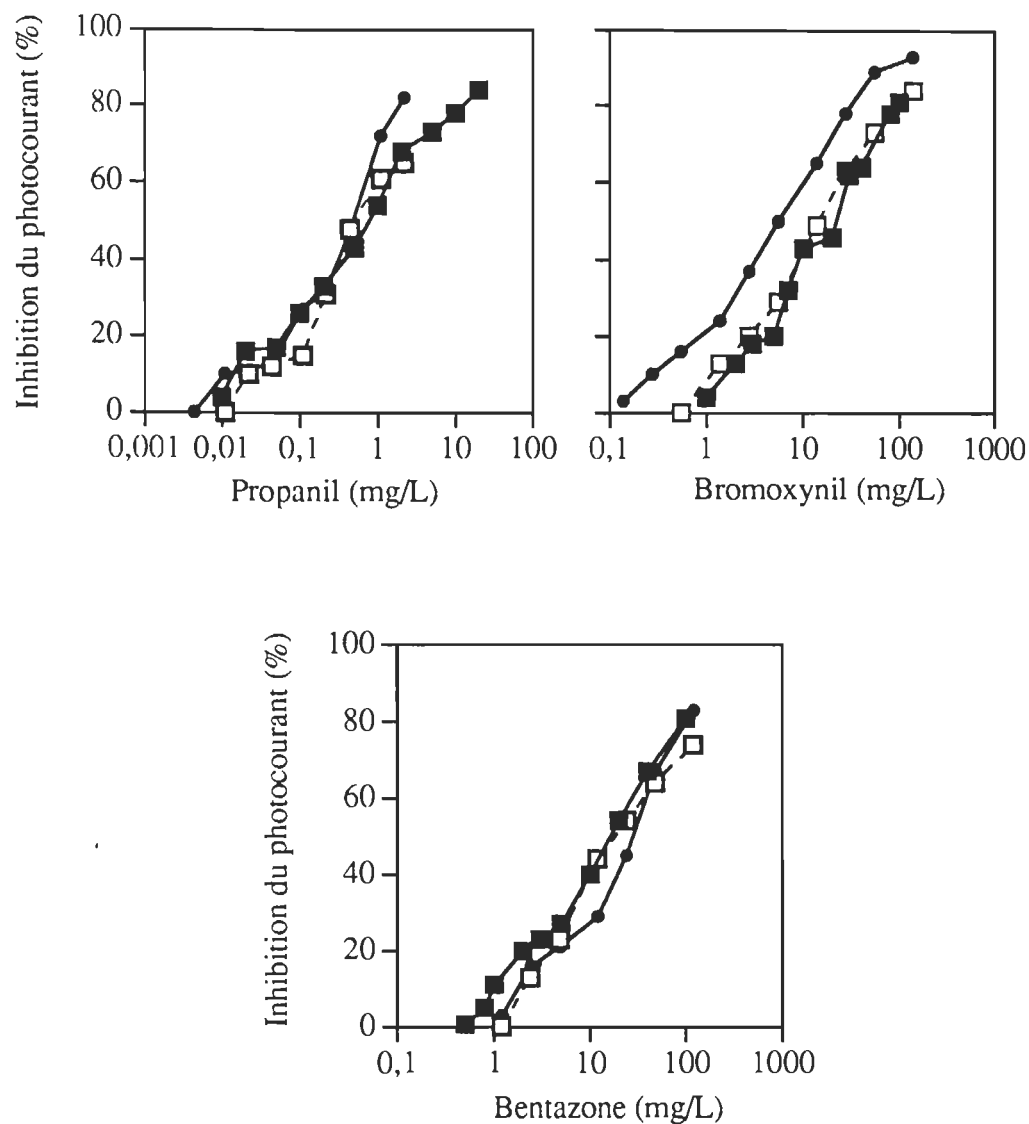


Figure 3. Inhibition du photocourant par le propanil, le bromoxynil et le bentazone. Les expériences ont été conduites avec des thylacoïdes immobilisés dans le PVA-SbQ et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (●) et avec des thylacoïdes immobilisés dans le BSA-Glu et un temps de contact herbicide-thylacoïdes de 5 min (□) et de 20 min (■).

CHAPITRE 5

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet de recherche a mis en évidence que les thylacoïdes immobilisés dans une matrice albumine-glutaraldéhyde pouvaient être avantageusement utilisés pour la biodétection d'herbicides dans une microcellule électrochimique.

Les conditions optimales d'expérimentation ont tout d'abord été évaluées relativement à la concentration en Chl ainsi qu'à l'éclairage approprié des échantillons. La caractérisation des paramètres a été faite en utilisant l'herbicide atrazine comme produit toxique de référence. Différentes concentrations en Chl dans la matrice d'immobilisation ont été testées et une concentration de 250 µg Chl/mL offrait la meilleure sensibilité de détection à l'atrazine. La réponse des échantillons de 250 µg Chl/mL a été étudiée sous différentes intensités lumineuses. La sensibilité de détection de l'atrazine diminuait avec une augmentation d'intensité lumineuse. L'utilisation d'une intensité de 1900 W/m² a été retenue puisqu'elle permettait de conserver un photocourant adéquat, celui-ci diminuant avec la baisse d'intensité lumineuse.

Les échantillons de thylacoïdes immobilisés ont pu être conservés sur une période de 10 jours à l'obscurité à 4° C. Ce résultat procure une marge de manœuvre intéressante pour un apport continu de matériel biologique. La comparaison des réponses à différents toxiques obtenues avec des thylacoïdes immobilisés et en suspension a établi que

l'immobilisation n'altérerait pas la capacité de détection des thylacoïdes, les CI50s étant similaires pour les deux types d'échantillons. De plus, le niveau de reproductibilité des CI50s des essais avec le toxique de référence se situait dans la marge acceptée pour les bioessais standardisés.

Des herbicides d'un usage courant en agriculture et appartenant à différentes familles chimiques ont ensuite été soumis au microtest à base de thylacoïdes immobilisés. Avec un temps de contact herbicide-thylacoïdes très court (20 min), les inhibiteurs spécifiques du transport photosynthétique d'électrons ont produit des réponses toxiques se comparant avantageusement aux CI50s-96 h d'un bioessai standardisé d'inhibition de croissance d'algues. Par contre, les herbicides ayant un mode d'action autre que l'inhibition de la photosynthèse ont démontré peu d'effet sur le transport photosynthétique d'électrons. Les thylacoïdes immobilisés possèdent donc le pouvoir de bien discriminer les deux types d'inhibiteurs et de ce fait le microtest s'avérerait efficace pour cibler les polluants susceptibles d'affecter le mécanisme photosynthétique.

Dans une étude complémentaire, l'immobilisation albumine-glutaraldéhyde a été comparée à une autre méthode d'immobilisation au regard de la sensibilité des thylacoïdes immobilisés à détecter des herbicides. Nous avons de nouveau constaté que la co-liaison des thylacoïdes dans la matrice albumine-glutaraldéhyde représentait une méthode d'immobilisation adéquate. En effet, cette méthode a présenté une performance de détection équivalente à l'inclusion des thylacoïdes dans un gel de poly(vinylalcool), une méthode ne comportant pas de liens covalents avec le matériel biologique.

Les avantages pratiques indéniables du microtest résident dans sa rapidité, sa simplicité d'utilisation et son faible coût. Ces caractéristiques sont particulièrement

intéressantes pour déceler ou surveiller un potentiel phytotoxique d'effluents ou de solutions chimiques, indiquant ainsi où diriger des analyses plus poussées.

Dans ce travail, les herbicides ont été étudiés individuellement en solution dans un tampon. Cependant, dans une application environnementale, les solutions à tester représentent des mélanges très complexes de molécules organiques et inorganiques créant parfois des effets additifs, synergiques ou antagonistes. Un axe futur de recherche serait de soumettre le microtest de phytotoxicité à divers effluents synthétiques contaminés de métaux et de polluants organiques. Par ailleurs, il serait aussi des plus intéressants de vérifier comment le microtest *in vitro*, utilisé dans une application réelle, reflète les résultats obtenus avec d'autres bioessais de phytotoxicité.

RÉFÉRENCES

- Agostiano A, Goetze DC, Carpentier R. 1992. Cyclic voltammetry measurements of the photoelectrogenic reactions of thylakoid membranes. *Photochem Photobiol* 55:449-455.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1989. *Biologie moléculaire de la cellule*, 2^e ed. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, France.
- Bermingham N, Boudreau D. 1994. Synthèse de l'application du barème d'effets écotoxiques potentiels (BEEP) et recommandations d'orientation pour son développement. Centre St-Laurent, Environnement Canada, Montréal, Canada.
- Chartrand J. 1992. Caractérisation de la réponse des membranes photosynthétiques à divers toxiques à l'aide d'une cellule électrochimique en vue de bioessais, Mémoire de Maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada.
- Environnement Canada. 1992. Méthode d'essai biologique: essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*. SPE 1/RM/24. Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa, Canada

- Parry KP. 1989. Herbicide use and invention. In Dodge AD, eds, *Herbicides and plant metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 1-20.
- Goetze DC, Carpentier R. 1990. Monitoring oxygen reduction by photosystem I in whole thylakoid membranes using a photoelectrochemical cell. *J Photochem Photobiol* 8:17-26.
- Hatzios K K. 1994. Herbicides and herbicides resistance. In Arntzen CJ, Ritter EM, eds, *Encyclopedia of Agricultural Science*, Vol 2. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 501-512.
- Kleczkowski LA. 1994. Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:339-361.
- Langevin R, Taché M, Lemire R. 1990. Revue critique et recommandations de biotests applicables à l'évaluation de la toxicité en milieu aquatique. SOMER pour le Centre St-Laurent, Environnement Canada, Montréal, Canada.
- Loranger C. 1992. Utilisation des membranes photosynthétiques immobilisées comme biocapteur de phytotoxicité, Mémoire de Maîtrise. Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada.

Lovett Doust J, Schmidt M, Lovett Doust L. 1994. Biological assessment of aquatic pollution. *Biol. Rev.* 69:147-186.

Mimeault M, Carpentier R. 1988. Electrochemical monitoring of electron transfer in thylakoid membranes. *Enzyme Microb Technol* 10:691-694.

Trebst A. 1980. Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites. *Methods Enzymol* 69:675-715.

Voet D, Voet JG. 1995. *Biochemistry*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.

ANNEXE A

Résumé long en français du chapitre 2.

Test *in vitro* de dépistage de la phytotoxicité,
utilisant des thylacoïdes d'épinard immobilisés.

INTRODUCTION

Afin de cerner les effets des toxiques sur les organismes vivants, des tests sont généralement conduits sur des organismes entiers représentant différents niveaux trophiques. Or, cette approche est coûteuse et demande un temps d'exécution considérable. Il existe donc un besoin pour des tests peu coûteux permettant une détection rapide de la toxicité d'effluents ou de substances chimiques.

Au cours de l'évolution, le mécanisme de la photosynthèse est demeuré similaire de la cyanobactérie jusqu'aux plantes vasculaires. Un toxique affectant la photosynthèse est donc potentiellement nocif pour toutes les espèces végétales. Plusieurs polluants retrouvés dans l'eau sont des inhibiteurs du transport photosynthétique d'électrons. Les herbicides entraînés dans les cours d'eau aux abords des terres agricoles en sont des exemples.

Une microcellule électrochimique utilisant des thylacoïdes pour générer un photocourant a été développée. Dans cette cellule, la lumière absorbée par les thylacoïdes conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène qui, s'oxydant sur une électrode de platine, produit le photocourant mesuré. Les inhibiteurs du transport photosynthétique d'électrons provoquent une diminution du photocourant produit.

Dans cette étude, les thylacoïdes isolés de feuilles d'épinard ont été immobilisés dans une matrice albumine-glutaraldéhyde afin de protéger et de stabiliser l'activité du matériel biologique. Les conditions optimales d'utilisation des thylacoïdes immobilisés dans la microcellule électrochimique ont été établies. La reproductibilité et les limites de détection de cette approche ont été déterminées en utilisant l'atrazine comme produit toxique de référence. Les réponses toxiques du test *in vitro* à une variété de produits ont

aussi été obtenues. Les performances de détection du microtest photosynthétique ont été comparées d'une part à des données de la littérature pour l'essai d'inhibition de croissance de l'algue *S. capricornutum* et d'autre part, aux critères de qualité de l'eau.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les thylacoïdes ont été isolés de feuilles d'épinard. La concentration en chlorophylle (Chl) de la suspension finale a servi à quantifier les thylacoïdes présents. La suspension obtenue a été séparée en aliquotes et entreposée à -80° C jusqu'à utilisation dans le protocole d'immobilisation.

La méthode d'immobilisation utilisée était similaire à celle décrite par Thomasset et al. (1982). Par cette méthode, les thylacoïdes sont co-liés dans une matrice faite d'albumine de sérum bovin (BSA) et de glutaraldéhyde. Les échantillons de thylacoïdes immobilisés étaient de petits disques spongieux de 80 µL (volume de la chambre de mesure de la microcellule).

La microcellule électrochimique comportait deux électrodes de platine concentriques, entre lesquelles un potentiel de 550 mV était établi. Un faisceau de lumière blanche était dirigé au-dessus de la cellule à l'aide d'une fibre optique. La cellule était maintenue à température constante (22° C), et le photocourant était suivi par un enregistrement sur papier.

Une incubation de 15 minutes dans une éprouvette mettait en contact l'échantillon de thylacoïdes immobilisés et la solution contenant l'inhibiteur. L'échantillon subséquemment transféré dans la microcellule était soumis à une équilibration de 5

minutes avant la lecture du photocourant. Le photocourant obtenu était exprimé en pourcentage d'inhibition par rapport aux contrôles.

La toxicité de chaque produit a été évaluée au moyen d'une courbe concentration-réponse. La concentration du toxique inhibant 50 % du photocourant du contrôle (CI50) et la concentration minimale du toxique avec effet observé (CMEO) ont été déterminées à partir de cette courbe.

RÉSULTATS

Établissement des conditions optimales

Différentes concentrations en Chl dans la matrice d'immobilisation ont été étudiées et une concentration de 250 µg Chl/mL s'est avérée être la concentration offrant la meilleure sensibilité de détection de l'atrazine.

La réponse des échantillons de 250 µg Chl/mL a aussi été étudiée sous différentes intensités lumineuses. La sensibilité de détection de l'atrazine diminuait avec une augmentation d'intensité lumineuse. L'utilisation d'une intensité de 1900 W/m² a été retenue puisqu'elle permettait de conserver un photocourant adéquat, celui-ci diminuant avec la baisse d'intensité lumineuse.

Les CI50s obtenues avec l'atrazine ainsi que le photocourant des contrôles ont servi à étudier la stabilité des thylacoïdes immobilisés sur une période de 15 jours d'entreposage à l'obscurité à 4° C. Les résultats ont montré que les échantillons de thylacoïdes

immobilisés étaient stables sur une période allant de 3 jours à 12 jours après l'immobilisation. Cependant, une période de 2 jours d'entreposage était nécessaire afin de permettre aux échantillons de se stabiliser. Par ailleurs, les échantillons ont présenté des signes de contamination après 15 jours d'entreposage.

La comparaison des réponses à différents toxiques obtenues avec des thylacoïdes immobilisés et en suspension a servi à s'assurer que l'immobilisation n'altérerait pas la capacité de détection des thylacoïdes, les CI50s étant similaires pour les deux types d'échantillons.

Reproductibilité du microtest de phytotoxicité

L'atrazine a été choisi comme produit toxique de référence afin d'établir une carte de contrôle définissant une plage de variabilité représentative du microtest. La moyenne et l'écart type d'un ensemble de dix-neuf CI50s ont produit un coefficient de variation de 23 %.

Il a déjà été mentionné (voir Matériel et Méthodes) que des aliquotes de thylacoïdes en suspension étaient conservées à -80° C et immobilisées au besoin. A l'aide de la carte de contrôle, les résultats ont montré que les thylacoïdes en suspension pouvaient être utilisés jusqu'à 8 semaines après l'extraction.

Réponses à différentes familles d'herbicides

Les herbicides représentant différentes familles chimiques ont été choisis parmi ceux d'un usage courant en agriculture. Parmi ces herbicides, les triazines et les urées substituées occupent une position préoccupante. En effet, des cas de contamination des cours d'eau ont souvent été rapportés.

Les réponses toxiques des herbicides inhibant le transport photosynthétique d'électrons et celles des herbicides ayant un mode d'action autre que la photosynthèse ont été comparées à des données de la littérature pour l'essai d'inhibition de croissance de l'algue *S. capricornutum*. Pour les herbicides inhibant le transport photosynthétique d'électrons, les CMEOs du microtest atteignaient une sensibilité comparable aux CI50s-96 h du test algal, et cela pour un temps de contact toxique-thylacoïdes de seulement 20 minutes. Le même profil toxique pour l'ensemble de ces herbicides était aussi observé pour le microtest avec thylacoïdes et pour le test algal: les triazines, les urées substituées et le propanil étaient très toxiques tandis que le bromoxynil était modérément toxique. De plus, les CMEOs du cyanazine, du métribuzin, du diuron et du propanil rencontraient les critères de qualité de l'eau brute.

Les herbicides ayant un mode d'action non-photosynthétique ont démontré peu d'effet sur le transport photosynthétique d'électrons, les CI50s et les CMEOs étant très élevées. En effet, les CMEOs des herbicides inhibant le transport photosynthétique d'électrons ont été inférieures d'environ cinq ordres de grandeur en comparaison des CMEOs de ces herbicides.

DISCUSSION

Les thylacoïdes étant extraits de feuilles d'épinard, le microtest décrit dans cette étude utilisait donc une «matière première» de très faible coût. De plus, l'extraction de thylacoïdes à partir de 100 g de feuilles procurait assez de matériel biologique pour effectuer une centaine de courbes concentration-réponse. Les thylacoïdes en suspension pouvaient être conservés jusqu'à 8 semaines à -80° C, évitant de devoir répéter souvent l'extraction de thylacoïdes. Par ailleurs, les thylacoïdes immobilisés ont été stables sur une période de 10 jours d'entreposage à l'obscurité à 4° C. Les thylacoïdes en suspension ne sont stables que quelques heures dans les mêmes conditions. La possibilité d'un entreposage prolongé des thylacoïdes (soit en suspension à -80° C ou immobilisés à 4° C) permet un apport constant de matériel biologique. En comparaison, les essais de phytotoxicité conventionnels requièrent l'entretien de cultures d'algues ou de plantes.

Avec un coefficient de variation de 23 %, le niveau de reproductibilité du microtest se situait au niveau accepté pour les bioessais reconnus. Le bioessai utilisant la bactérie luminescente *P. phosphoreum* et le bioessai d'inhibition de croissance de l'algue *S. capricornutum* ont servi d'exemples pour appuyer cette affirmation.

Les réponses toxiques obtenues avec des herbicides ayant différents modes d'action, ont démontré que le microtest à base de thylacoïdes immobilisés offrait une grande spécificité pour les inhibiteurs du transport photosynthétique d'électrons. Les CMEOs des herbicides ne ciblant pas la photosynthèse étaient si élevées qu'il serait impossible de retrouver ces concentrations dans l'environnement. Les résultats ont établi que les

thylacoïdes immobilisés possédaient le pouvoir de bien discriminer les deux types d'herbicides.

Plusieurs études ont rapporté qu'il existait selon les espèces d'algues considérées, des sensibilités différentes aux herbicides. Par sa nature, le microtest pourrait servir à mettre en évidence les polluants susceptibles d'affecter le transport photosynthétique d'électrons sans interférence avec d'autres processus physiologiques.

Les autres approches pour mesurer l'activité du transport photosynthétique d'électrons sont principalement basées sur la fluorescence de la Chl *a* et sur les mesures de dégagement d'oxygène. L'interprétation des résultats est plus difficile avec la fluorescence qu'avec l'approche électrochimique. Quant aux mesures de dégagement d'oxygène, elles nécessitent l'apport d'un accepteur artificiel d'électrons qui pourrait interférer avec les polluants à détecter. De plus, les mesures de dégagement d'oxygène sont limitées au photosystème II contrairement à l'approche électrochimique qui implique les réactions de toute la chaîne de transport photosynthétique. Les mesures à la cellule électrochimique sont effectuées facilement, rapidement (5 min) et n'utilisent que de très petits volumes de solutions toxiques.

Le microtest à base de thylacoïdes immobilisés pourrait s'avérer efficace pour dépister rapidement les toxiques ayant pour cible le mécanisme photosynthétique.

ANNEXE B

Résumé long en français du chapitre 3.

Étude comparative de la sensibilité des thylacoïdes pour la détection d'herbicides,
selon une immobilisation chimique ou physique des thylacoïdes.

Introduction

La détection des polluants qui interfèrent avec la photosynthèse est de première importance car ce mécanisme est vital chez toutes les espèces végétales. Afin d'évaluer les dommages causés à la chaîne de transport photosynthétique d'électrons, un test utilisant des thylacoïdes comme outil de détection dans une microcellule électrochimique a été développé. Dans cette microcellule, l'énergie lumineuse absorbée par les thylacoïdes est convertie en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène est ensuite oxydé sur une électrode de platine produisant un photocourant. L'effet inhibiteur d'un polluant est suivi par la diminution du photocourant.

Cependant, la fragilité des préparations de thylacoïdes constitue un facteur limitant dans la perspective d'une application biotechnologique. Diverses techniques d'immobilisation des thylacoïdes ont alors été élaborées afin de protéger et de stabiliser leurs fonctions biologiques.

Dans cette étude, l'approche électrochimique décrite ci-dessus a servi à comparer deux méthodes d'immobilisation au regard de la sensibilité des thylacoïdes immobilisés à détecter neuf herbicides ciblant le photosystème II. Les méthodes d'immobilisation utilisées ont été l'inclusion des thylacoïdes dans un gel de poly(vinylalcool) portant des groupements styrylpyridinium (PVA-SbQ) et la co-liaison des thylacoïdes dans une matrice formée d'albumine de sérum bovin et de glutaraldéhyde (BSA-Glu). L'immobilisation PVA-SbQ est une immobilisation physique sans liens covalents avec le matériel biologique, celui-ci étant seulement emprisonné dans le réseau formé par le PVA-SbQ polymérisé. Quant à l'immobilisation BSA-Glu, elle consiste en une immobilisation chimique car le

glutaraldéhyde établit un réseau de liaisons covalentes avec les NH_2 libres des protéines membranaires des thylacoïdes.

Les deux techniques d'immobilisation ont présenté une grande similitude dans leur performance de détection des herbicides en dépit de leurs modes d'immobilisation fort différents.

Matériel et Méthodes

Les thylacoïdes ont été isolés de feuilles d'épinard. La concentration en chlorophylle (Chl) de la suspension finale a servi à quantifier les thylacoïdes présents. La suspension obtenue a été séparée en aliquotes et entreposée dans l'azote liquide jusqu'à utilisation dans les protocoles d'immobilisation.

Dans cette étude, tous les échantillons ont été immobilisés à partir de la même préparation de thylacoïdes. Les échantillons de thylacoïdes immobilisés selon la technique PVA-SbQ étaient conservés à sec et contenaient 6 μg de Chl tandis que les échantillons immobilisés selon la technique BSA-Glu étaient conservés sous un tampon et contenaient 20 μg de Chl. Tous les échantillons étaient entreposés à l'obscurité à 4° C.

La microcellule électrochimique comportait deux électrodes de platine concentriques, entre lesquelles un potentiel de 550 mV était établi. Un faisceau de lumière blanche était dirigé au-dessus de la cellule à l'aide d'une fibre optique. La cellule était

maintenue à température constante (22° C), et le photocourant était suivi par un enregistrement sur papier.

Un échantillon de thylacoïdes immobilisés était introduit dans la chambre de mesure qui était ensuite remplie soit du tampon de lecture (contrôle), soit d'une dilution d'un herbicide dans ce même tampon. L'échantillon était soumis à une équilibration de 5 minutes avant la lecture du photocourant. Le photocourant obtenu était exprimé en pourcentage d'inhibition par rapport aux contrôles. La concentration de l'herbicide inhibant 50 % du photocourant du contrôle (CI50) a été estimée au moyen de l'analyse probit.

Résultats et discussion

Les tracés obtenus ont été semblables pour les deux techniques d'immobilisation mais les échantillons de l'immobilisation PVA-SbQ produisaient deux fois plus de photocourant que les échantillons de l'immobilisation BSA-Glu. Néanmoins, le photocourant des échantillons de l'immobilisation BSA-Glu était largement suffisant pour effectuer des mesures adéquates.

Trois herbicides ont été choisis pour illustrer les trois cas rencontrés (*Figure 2*). L'herbicide cyanazine illustre le cas où les échantillons BSA-Glu ont été plus sensibles, la même sensibilité de détection a été observée avec le diuron tandis que pour le bromoxynil, les échantillons PVA-SbQ ont été plus sensibles. Pour les neuf herbicides évalués, le pourcentage d'inhibition des échantillons BSA-Glu était toujours, à fortes concentrations, inférieur au pourcentage d'inhibition des échantillons PVA-SbQ. Il serait intéressant de

rechercher les raisons de cette observation car elles pourraient contribuer à améliorer la sensibilité de détection des échantillons BSA-Glu.

Une comparaison des deux méthodes d'immobilisation portant sur les droites de régression issues des courbes concentration-réponse, a montré que pour sept herbicides les pentes de ces droites étaient similaires, i. e. des droites parallèles ou superposées. Pour les herbicides cyanazine et hexazinone, les pentes des droites de régression de l'immobilisation PVA-SbQ étaient le double des pentes de l'immobilisation BSA-Glu. Des pentes plus élevées étant reliées à une chute plus abrupte de l'inhibition avec la diminution de la concentration de l'herbicide, l'étendue des concentrations détectables d'herbicide s'en trouve réduite.

Pour tous les herbicides évalués, les réponses toxiques obtenues avec des thylacoïdes immobilisés selon les deux méthodes ont été rapprochées, les différences étant inférieures à un ordre de grandeur. Pour l'atrazine, le diuron et le bromoxynil, représentant chacun une famille différente d'herbicides, les CI50s obtenues avec des thylacoïdes immobilisés et des thylacoïdes natifs ont aussi été comparées. Les résultats ont permis de constater que les deux méthodes d'immobilisation procuraient aux thylacoïdes immobilisés une sensibilité de détection comparable aux thylacoïdes natifs. Les matrices d'immobilisation créent une barrière entre les thylacoïdes et les toxiques à capter. Une diminution de la diffusion des molécules (inhibiteurs ou molécules électro-actives) ou une adsorption des molécules d'inhibiteur sur les matrices sont des phénomènes susceptibles d'être présents. Il a été rapporté que les réactions du glutaraldéhyde avec les protéines des thylacoïdes provoquaient des rotations et des réarrangements intramoléculaires. Néanmoins, nos résultats ont mis en évidence que les deux matrices d'immobilisation ainsi

que les environnements qu'elles créent, offraient aux molécules une diffusion comparable et pour les inhibiteurs, une accessibilité semblable à leurs sites de liaison.

Une comparaison graphique de la sensibilité aux neuf herbicides des thylacoïdes immobilisés selon les deux méthodes a été présentée (*Figure 3*). Les légères différences observées provenaient du cyanazine, de l'hexazinone, du métribuzin et du bromoxynil. Cependant, les thylacoïdes immobilisés selon la méthode BSA-Glu ont été plus sensibles au cyanazine et à l'hexazinone tandis que les thylacoïdes immobilisés selon la méthode PVA-SbQ ont été plus sensibles au métribuzin et au bromoxynil.

D'un point de vue pratique, les échantillons issus de l'une ou l'autre des méthodes d'immobilisation se manipulaient avec la même facilité pour les mesures électrochimiques. Cependant, les propriétés physico-chimiques des échantillons diffèrent. Les échantillons PVA-SbQ sont hydrophiles et se désagrègent lors d'un contact prolongé avec une solution aqueuse. Au contraire, l'immobilisation BSA-Glu produit une matrice insoluble adéquate pour une incubation prolongée favorisant ainsi la détection de toxiques ayant un temps de réaction plus lent.

La préservation à sec des échantillons PVA-SbQ constitue un avantage de cette méthode puisqu'elle prévient la contamination microbienne. Une contamination pouvait être observée avec les échantillons BSA-Glu après un entreposage de deux semaines même à 4° C.

En conclusion, cette étude comparative a montré que les deux approches d'immobilisation avaient, pour les herbicides testés, des performances de détection équivalentes.